

รหัสโครงการ SUT 3-305-53-12-24



รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดย่านาง
เครือหมาน้อย และรางจืด

**(Bioactivity and Functional properties of Yanang, Krueo Manoy
and Rang Chuet extracts)**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดย่านาง เครือหมา น้อย และรางจืด

(Bioactivity and Functional properties of Yanang, Krueo Manoy
and Rang Chuet extracts)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ดร.รัชฎาพร อุ่นศิริไธย์

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. ดร.จิราวรรณ อุ่นเมตตาอารี

2. ดร. จิตรา สิงห์ทอง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์ที่
กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะ และให้ความช่วยเหลือในการศึกษาวิจัยอย่างดียิ่งตลอดมา และนักศึกษา
ปริญญาเอก สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวก
สะดวกในการใช้ห้องเซลล์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณวันชัย จอกระโทก และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 1, 3 และ 9 มหาวิทยาลัย
เทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่เสียสละเวลา ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดี
ตลอดมา ขอขอบคุณโรงพยาบาลครบุรีสำหรับ วัตถุดิบรังจืด เพื่อใช้ในการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553



บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวเพื่อเป็นองค์ความรู้ประกอบสำหรับการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่ถูกต้องและเหมาะสม โดยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดย่านาง เครือหมาน้อย และรางจืด ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic) การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยเตรียมสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำ แอทานอล และอะซีโตน จากการศึกษาพบว่าปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำมีปริมาณสูงสุด (2,634.87 mg GAE /100 g RM) รองลงมาได้แก่สารสกัดน้ำเครือหมาน้อยและย่านาง (1,940.73 mg GAE /100 g RM และ 978.99 mg GAE /100 g RM) ตามลำดับ ส่วนสารสกัดรางจืดด้วยอะซีโตนมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดต่ำที่สุด (81.58 mg GAE / 100 g RM) และเมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดรางจืดน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดที่ค่า IC_{50} 3.920 mg/ml, 1.598 mg/ml และ 0.254 mmol Fe^{2+} /g RM ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดน้ำของสมุนไพรทั้งสามชนิด รองลงมาได้แก่เครือหมาน้อย และย่านาง ตามลำดับ

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดสมุนไพรทั้งสามชนิดโดยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Colorimetric assay พบว่า สารสกัดรางจืดเอทานอลมีความสามารถในการเป็นสารต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ดีที่สุดใน Caco-2 cell lines รองลงมาคือสารสกัดเครือหมาน้อยและสารสกัดย่านาง โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 100 μ g ของสารสกัด/ml ดังนั้นสมุนไพรทั้งสามชนิดจึงจัดอยู่ในประเภทของสารที่มีความเป็นพิษต่ำ

Abstract

Tiliacora triandra (Colebr.) Diels (Yanang), *Cissampelos pareira* (Kreu MA noy) and *Thunbergia Laurifolia* Lindl(Rang chuet, RC) are widely described in traditional medicine for protection against dietary and environmental toxicant. These plants have been used for long time but less scientific information. The objectives of study are investigated bioactivity of the extracts for useful information could be provide a better understanding of the antioxidant properties and cytotoxicity for further investigation and development into value-added food products and nutraceuticals.

Antioxidant activities and total phenolic content of all three crude extracts were evaluated using DPPH, ABTS, FRAP assays and the Folin-Ciocalteu method. It was found that RC water crude extract showed the highest total phenolic content (2,634.87 mg GAE /100 g RM) compared to Yanang and Kreu Ma Noy at total phenolic content of 1,940.73 mg GAE /100 g RM and 978.99 mg GAE /100 g RM respectively. The lowest phenolic content founded in RC acetone crude extract at the value of 81.58 mg GAE / 100 g RM. In addition, RC water crude extract displayed the highest antioxidant activities determined by DPPH assay, ABTS assay and FRAP assay at the IC_{50} 3.920 mg/ml, 1.598 mg/ml and 0.254 mmol Fe^{2+} /g RM. Antioxidant activity followed by RC, Yanang, Kreu Ma Noy respectively.

All crude extracts were subsequently investigated for their cytotoxicity in Caco-2 cell lines. The low toxicity was indicated at concentrations higher than 100 μ g/mL for all crude extracts, which would be the index for further recommended concentration use.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตของการวิจัย	1
ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
การเตรียมสารสกัดย่านาง เครื่องหมายน้อย และรางจืด	14
การวิเคราะห์ปริมาณของ Total Phenolic	14
การวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	14
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay	16
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
อภิปรายผล	17
บทที่ 5 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	26
บรรณานุกรม	27
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์	31
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์	34
ประวัติคณะผู้วิจัย	38

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 : ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดย่านาง, รังจี๊ด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	17
ตารางที่ 2 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ของสารสกัดย่านาง, รังจี๊ด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	19
ตารางที่ 3 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ของสารสกัดย่านาง, รังจี๊ด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	21
ตารางที่ 4 : สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดย่านาง, รังจี๊ด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	22
ตารางที่ 5 : แสดงค่า IC_{50} ($\mu\text{l/ml}$) ของสารสกัดย่านาง เครือหมาน้อยและรังจี๊ดต่อ Caco-2 cell lines	24

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)	6
รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt	7
รูปที่ 3 ปฏิกริยาของ FRAP assay	8
รูปที่ 4 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	18
รูปที่ 5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	20
รูปที่ 6 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	21
รูปที่ 7 สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	23

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อาหารเสริมสุขภาพในไทยมีมานานแล้ว ควบคู่การใช้สมุนไพรเพื่อป้องกันรักษาโรค โดยเป็นการใช้สมุนไพรเพื่อให้แข็งแรงและอายุยืน ที่เรียกเป็น ยาอายุวัฒนะ หรือเสริมพลังกำลัง ที่เรียกเป็น ยาบำรุง ยาโป้ว เช่น โสม เขากวางอ่อน หูลาม ปลิงทะเล รังนกนางแอ่น ตลอดจนอวัยวะสัตว์หายากบางชนิด เช่น คีหิมี เลือดแรด ซึ่งปัจจุบันได้เตรียมมาในรูปแบบที่ใช้ได้สะดวก และมีการศึกษาสรรพคุณทางวิทยาศาสตร์มากขึ้น ทำให้การยอมรับเป็นไปในวงกว้าง จากการใช้ในผู้สูงอายุหรือผู้ที่ร่างกายไม่ค่อยแข็งแรง มาเป็นคนที่ทุกเพศทุกวัยที่ต้องการมีสุขภาพแข็งแรง มีมูลค่าทางการตลาดมากกว่า 30,000 ล้านบาท และมีแนวโน้มจะขยายตัวไม่ต่ำกว่าร้อยละ 30-40 ต่อปี

ผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพเหล่านี้ ส่วนมากนำเข้าและขายโดยตรงต่อผู้บริโภค โดยอ้างว่ามีประโยชน์มากมายมหาศาล สามารถรักษาโรคได้หลายอย่าง ถ้าพิจารณาในแง่การป้องกันดูแลรักษาสุขภาพแบบองค์รวม ของเหล่านี้อาจช่วยส่งเสริมการสร้างภูมิคุ้มกัน ปรับสมดุลร่างกาย จึงมีผลให้สุขภาพดีขึ้น แต่บางชนิดอาจก่อให้เกิดอันตรายได้ เช่น ถ้าใช้ในขนาดสูง หรือในระยะเวลาอันยาวนาน อาจบดบังอาการของโรคที่เป็นอยู่ หรืออาจเป็นพิษเฉียบพลัน/ พิษเรื้อรังได้

ดังนั้น การใช้ผลิตภัณฑ์จึงควรร่วมกับการมีพฤติกรรมบริโภคที่ถูกต้อง และอยู่ในความดูแลของผู้ที่มีความรู้พื้นฐานเรื่องสุขภาพและผลิตภัณฑ์ดีพอ เพื่อจะได้มีการใช้ให้เหมาะสมต่อสภาพร่างกายของแต่ละบุคคล ในช่วงเวลานั้น และผลิตภัณฑ์ที่ใช้ส่วนมากเป็นสมุนไพร จะต้องมีประสิทธิภาพดีพอควรมีการควบคุมคุณภาพและมาตรฐานเช่นเดียวกับสมุนไพร แม้กระทรวงสาธารณสุขยังไม่มีประกาศกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน โดยเฉพาะสำหรับอาหารเสริมสุขภาพทั่วไป เนื่องจากมีสูตร ส่วนประกอบแตกต่างกันมากก็ตาม

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดย่านาง เครื่องหมายน้อย และรางจืด ได้แก่ ศึกษาหาปริมาณ Total phenolic ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนการทดลองได้แก่

- 3.1 การเตรียมสารสกัดย่านาง เครื่องหมายน้อย และรางจืด โดยใช้สารสกัดสามชนิดคือน้ำ อะซีโตน และ เอทานอล

3.2 ศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดย่านาง เครื่องหมายน้อย และ รางจืด

3.2.1 ศึกษาหาปริมาณ Total phenolic

3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

3.2.3 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์

4. ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)

ความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างโภชนาการ และสุขภาพ มีผลต่อการพัฒนา
แนวความคิดของอาหารเชิงหน้าที่ (Functional Food) ซึ่งหมายถึงการปฏิบัติและการเข้าหาแบบใหม่
ๆ เพื่อที่จะได้รับภาวะสุขภาพที่แข็งแรงโดยสนับสนุนการกินคืออยู่ดีและลดภาวะความเสี่ยงต่อการ
เป็นโรค การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับอาหารเชิงหน้าที่ กับ การป้องกันโรคเรื้อรังที่ไม่มีการติดต่อ ได้แก่
โรคมะเร็ง ได้กระตุ้นความสนใจในสารพฤกษเคมีจากพืชในแง่ขององค์ประกอบที่เป็นสารออกฤทธิ์
อาหารโดยเฉพาะการนำพืชสมุนไพรมาบริโภคในแง่ของการรักษา ป้องกันโรคตามแนวปฏิบัติดั้งเดิม
ในปัจจุบันความสนใจในด้านผลของอาหารต่อสุขภาพมีเพิ่มมากขึ้น แต่การนำสมุนไพรมาใช้บริโภค
ในปัจจุบันยังขาดองค์ความรู้ที่ถูกต้องในด้านของฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณสมบัติเชิงหน้าที่ การเตรียม
สมุนไพรในการบริโภค รวมทั้งการนำสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ในอาหาร งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่
จะศึกษากรรมวิธีการเตรียมสารสกัด ฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณสมบัติเชิงหน้าที่ พร้อมทั้งการเตรียมไม
โครแคปซูลของสารสกัดสมุนไพรเพื่อนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ
หรืออาหารฟังก์ชัน (Functional Food)

5. วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

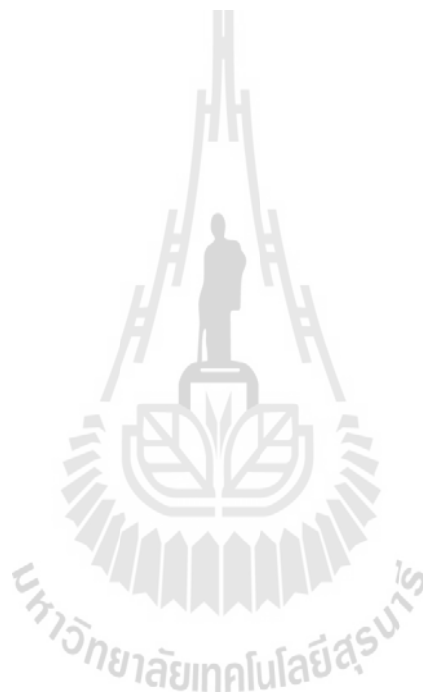
1. เตรียมสารสกัดย่านาง เครื่องหมายน้อย และรางจืดตามวิธีของ Jittra และคณะ (2006) และ
รัชฎาพรและ คณะ (2007)
2. ศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดย่านาง เครื่องหมายน้อย และรางจืด
 - 2.1 ศึกษาหาปริมาณ total phenolic โดยวิธี Folin-Ciocalteu method (Prior et al, 2007)
 - 2.2 ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay, FRAP assay, แล
และ ABTS (Bae and Suh, 2007)
2. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
diphenyltetrazolium bromide) colorimetric assay (Netzel *et al.*, 2007)

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำ
ผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผู้ใช้ประโยชน์จากการวิจัย

1. นักวิชาการที่ทำวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรไทย

2. กลุ่มประชากรเป้าหมายที่ผลิตและจำหน่ายสมุนไพร
 3. ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดสมุนไพรธรรมชาติเป็นส่วนประกอบ
7. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยี หรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย
- 7.2 นำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ
 - 7.3 จัดฝึกอบรมแก่กลุ่มประชากรเป้าหมายหรือหน่วยงานในท้องถิ่นที่ผลิตและจำหน่ายสมุนไพร และผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดสมุนไพรธรรมชาติเป็นส่วนประกอบ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. สารประกอบฟีนอลในพืชและคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน

คุณสมบัติที่ได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันของสารประกอบฟีนอล คือการเป็นสารต้านออกซิเดชัน และสารต้านการกลายพันธุ์ (antimutagens) ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ (free radical) และการใช้สารประกอบฟีนอลในการป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคหัวใจขาดเลือด และมะเร็ง โดยสารประกอบฟีนอลจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระและไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ของไขมันและโมเลกุลอื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็วดังปฏิกิริยาต่อไปนี้ (Husain และคณะ 1989; Rice-Evans และคณะ 1997)



เมื่อ ROO^\bullet , RO^\bullet คือ free radicals, PPH คือ polyphenolic compound

เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีเสถียรภาพ ดังนั้นจึงไม่ทำปฏิกิริยาอื่นต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลบางชนิดยังคงสามารถรวมตัวกับอนุมูลอิสระอื่นได้อีกด้วย จึงทำให้สารประกอบฟีนอลเหล่านั้นลดจำนวนอนุมูลอิสระลงได้ถึง 2 เท่า ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



สารประกอบฟีนอลที่ถูกพบว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน นั้น สามารถพบได้ในส่วนต่างๆของพืช เช่น เมล็ด (ได้แก่ ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย ข้าวและงา) ผล (ได้แก่ ฝรั่ง ส้ม และ พริกไทยดำ) ใบ (ได้แก่ ชา และเครื่องดื่มต่างๆ) และส่วนอื่นๆ (ได้แก่ มันเทศ และหัวหอม) และหนึ่งในสารประกอบฟีนอลที่เป็นที่รู้จักกันดีก็คือ flavonoids (ได้แก่ flavones, flavonols, isoflavones, catechins, flavonones และ chalcones) และ cinnamic acid derivatives (caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid และอื่นๆ) โดยสามารถพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืชแต่จะมีความแตกต่างกันออกไปในด้านของชนิดและปริมาณ

2. อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ โมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโคเดเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมาก 10-13-10-10 วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยสามารถตรวจวัดด้วยเทคนิค electron spin resonance (ESR) โมเลกุลหรือไอออนชนิดนี้เป็นตัว

ก่อให้เกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ ขกตัวอย่างเช่น superoxide anion radical (O_2^{\bullet}), hydroxyl radical (HO^{\bullet}) และ peroxide radical (ROO^{\bullet}) เป็นต้น (Punchard and Kelly, 1996)

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมตามปกติในร่างกาย หรือเกิดจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมา เพื่อสู้กับเชื้อโรคบางชนิด
2. อนุมูลอิสระที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งได้แก่ สารเคมีและ สิ่งปนเปื้อนที่มากับอากาศที่เราหายใจเข้าไป สารเคมีแต่งอาหาร สีผสมอาหาร สารเคมีปนเปื้อนในอาหาร สารกันบูด หรือสารเคมี ต่างๆ ที่ใช้ในการเกษตร ฯลฯ

จากที่กล่าวมาแล้วว่า อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายเอง และในภาวะที่ผิดปกติ เช่น ภาวะของโรค หรือภาวะที่ร่างกายแวดล้อมด้วยมลพิษ โดยภาวะที่ผิดปกติ จะส่งผลให้ร่างกายเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจำเป็นที่ร่างกายต้องหาทางป้องกัน สิ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อปกป้องตัวเองก็คือ ระบบต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งประกอบไปด้วยสารหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ก็สามารถชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา แต่อย่างไรก็ตามมีบางภาวะที่ปริมาณอนุมูลอิสระมีมากเกินไปที่ระบบต้านอนุมูลอิสระจะจัดการได้ จะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress ขึ้นมา ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต และรุนแรง ไปถึงการเกิดโรค

ด้วยเหตุนี้มนุษย์เราจึงจำเป็นต้องรับประทานอาหารที่เป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชัน ได้แก่ วิตามิน เอ วิตามิน ซี วิตามิน อี สารสกัดจากพืชชนิด

คุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลทางเคมีที่ใช้มีความหมายว่า เป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระ (radical) ซึ่งนั่นคือ ความสามารถในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล สำหรับสารประกอบฟีนอล สามารถนิยามความหมายของคำว่า สารต้านออกซิเดชัน ได้โดยอาศัยหลักพื้นฐาน 2 ข้อ ดังนี้คือ

1. ที่ความเข้มข้นต่ำๆ สารตั้งต้นก็จะสามารถถูกชะลอ หรือสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาได้
3. อนุมูลอิสระ (radical) ที่ถูกกำจัดออกไปแล้วจะต้องมีความเสถียร (stable)

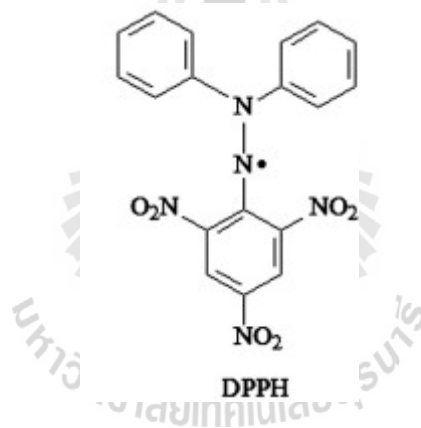
3. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอล และ ตรวจสอบความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชัน

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระ

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระเป็นการความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันของโมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว โดยวิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ 2, 2-azobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ the oxygen radical absorption capacity (ORAC) และอื่นๆ ซึ่งมักนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นตัวต้านออกซิเดชันในผักและผลไม้ชนิดต่างๆ

3.1 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (รูปที่ 1) เป็น stable radical ในตัวทำละลาย methanol ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 nm



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH radical)

(Osman, 2011)

โดย DPPH[•] จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R[•]) ได้ดังสมการที่ (1.1) และ (1.2)

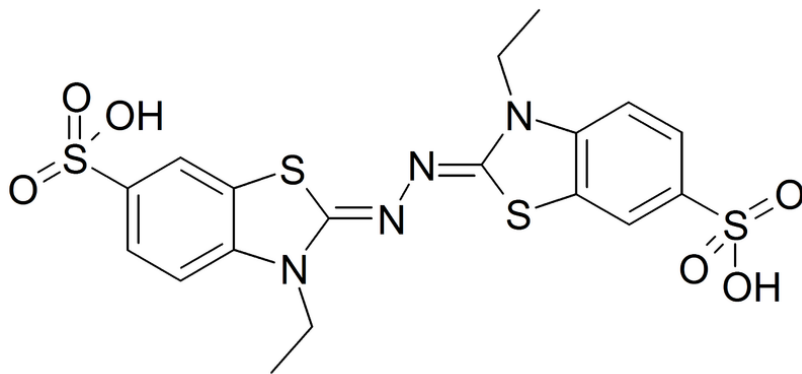


ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC₅₀) ซึ่งหมายถึง

ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH[•] เหลืออยู่ 50% (Brand- William et al., 1995 และ Gil et al., 2002)

3.2 วิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical -scavenging assay : (ABTS assay)

ABTS assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (รูปที่ 1.15) เป็น stable radical ใน aqueous solution สารละลายนี้มีสีเขียว ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 734 nm รูปที่ 1.15 สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของ 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt

การทำให้เกิด ABTS cation radical ทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. ใช้ enzyme reaction คือ ใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันให้เกิด ABTS cation radical เช่น peroxidase, myoglobin เป็นต้น
2. ใช้ chemical reaction โดยใช้สารเคมี เช่น manganese dioxide, potassium persulfate, 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane)(ABAP) เป็นต้น



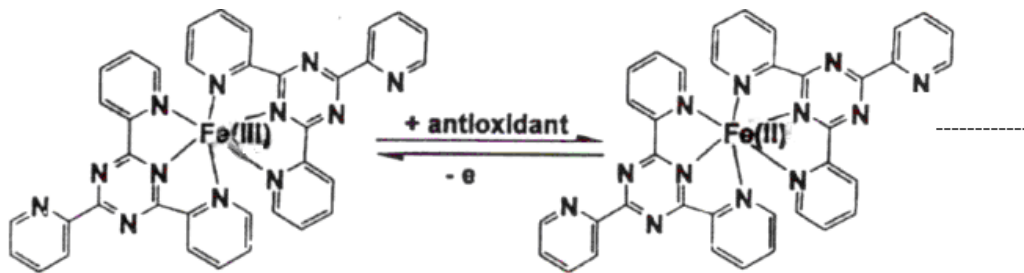
antioxidant (AH) จะทำปฏิกิริยากับ ABTS⁺ ดังนี้



มีผลให้ความเข้มของสารละลายสีเขียวลดลงด้วย โดยจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC₅₀) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS⁺ เหลืออยู่ 50% หรือรายงานผลเป็น 50% inhibition concentration (IC₅₀) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ ABTS⁺ ลดลง 50%

3.3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP assay)

FRAP assay เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชัน โดยอาศัย ปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน คือ เมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน แล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ดังสมการ



รูปที่ 3 ปฏิกิริยาของ FRAP assay

วิธี FRAP สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า absorbance ที่ 595 nm จากนั้นศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันในสารตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Ferrous sulfate แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ เสียค่าใช้จ่ายน้อย สะดวก รวดเร็ว มีขั้นตอนในการทดลองไม่ยุ่งยาก ชับซ้อนและมี reproducibility ดี (Benzie and Strain, 1999; Guo et al., 2003; Jimenez-Escrig et al., 2001)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเซลล์ หมายถึง การรักษาสภาพมีชีวิต การเจริญเติบโต และพัฒนาการของเซลล์สัตว์ ภายใต้สภาวะนอกร่างกาย (ในอาหารเลี้ยงเซลล์) ที่เหมาะสม ติดต่อกันเป็นเวลานาน เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เกิดขึ้นจากความต้องการศึกษาพฤติกรรมและกระบวนการต่างๆของเซลล์ที่ปลอดจากการรบกวนของปัจจัยต่างๆที่เกิดขึ้นจากตัวสัตว์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ สายพันธุ์ (cell lines) หรือเซลล์จากอวัยวะสิ่งมีชีวิต (primary cell culture) หรือการใช้ subcellular preparations (ส่วนประกอบระดับเซลล์) โดยเฉพาะเพื่อใช้ในการวิจัยทางด้านเภสัชวิทยา และพิษวิทยา ซึ่งก่อนหน้านี้อาศัยเฉพาะสัตว์ทดลองเท่านั้น การทดลองโดยวิธีการที่เกี่ยวกับเซลล์ดังกล่าวจัดเป็นการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (in vitro test) ซึ่งเป็นการศึกษาถึง ข้อมูลเบื้องต้นหรือข้อมูลขั้นพื้นฐานในระดับเซลล์เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาขั้นสูงในสัตว์ทดลอง (in vivo test) ต่อไปตลอดจนการนำผลที่ได้มาใช้ทดลองทางคลินิกในคนในที่สุด อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้มาจากการศึกษาในเซลล์สายพันธุ์ (cell lines) อาจเป็นเพียงข้อมูลขั้นพื้นฐานซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อในเซลล์จากอวัยวะของสิ่งมีชีวิต (primary cell culture) ทั้งนี้ขึ้นกับการ

นาผลไปใช้ว่าต้องการความเฉพาะเจาะจงถึงขั้นไหน ตัวอย่างเช่น งานวิจัยทางด้านเภสัชวิทยาที่เน้นไปในแง่พิษวิทยานั้นเป็นการศึกษาถึงขบวนการเมตาบอลิซึมซึ่งรวมไปถึงการกำจัดยาหรือสารเคมีที่เข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากขบวนการดังกล่าวเป็นหน้าที่ของอวัยวะตับและไต ดังนั้นการทดสอบในหลอดทดลองจึงจำเป็นต้องใช้เซลล์ที่ได้มาจากอวัยวะนั้น ๆ โดยอาศัยกระบวนการแยกเซลล์จากอวัยวะดังกล่าวเพื่อนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองและทำการทดสอบต่อไป

จะเห็นว่า primary cell culture มีประโยชน์ต่อการศึกษาทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยา โดยเฉพาะการทดสอบในแง่การตรวจกรอง (screening) หรือการศึกษาเชิงเปรียบเทียบก่อนที่จะตัดสินใจเลือกใช้โมเลกุลตัวทดลองที่เหมาะสม เพราะวิธีดังกล่าวเป็นการช่วยลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองเนื่องจากจำนวนเซลล์ตับหรือไตที่ได้จากหนูทดลอง 1 ตัว สามารถนำมาเตรียมเป็นเซลล์ได้จำนวนมากสำหรับใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้ยังเป็นการลดต้นทุนในการทดลองอีกด้วยข้อได้เปรียบของการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (in vitro test) คือ ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือสูงระดับหนึ่งเพราะเป็นการทดสอบในเซลล์ซึ่งเป็นหน่วยย่อยที่สุดของสิ่งมีชีวิตขั้นตอนและวิธีการทาง่ายไม่ซับซ้อนเมื่อเทียบกับการทดสอบในสัตว์ทดลอง ไม่มีผลรบกวนจากระบบไหลเวียนโลหิต และระบบฮอร์โมนที่ง่ายต่อการแปรผล ปริมาณสารที่ใช้ทดสอบใช้ในปริมาณน้อย สามารถทดสอบจำนวนตัวอย่างหลายตัวอย่างในการเตรียมเซลล์แต่ละครั้ง

ดังนั้นเห็นได้ว่า เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นทางเลือกหนึ่ง เพื่อทดแทนการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองในอนาคต จากการศึกษาของ National Research Council ของสหรัฐฯ สรุปผลว่า การทดสอบสารเคมีในสัตว์ทดลองเพื่อวัดความเป็นพิษในมนุษย์นั้นควรจะลดลงและยกเลิกในที่สุด และเสนอว่าควรมีการทดลองในเซลล์ เซลล์ไลน์ (cell line) หรือส่วนประกอบของเซลล์ (cellular compound) ทดแทน ทั้งนี้เนื่องจากวิทยาศาสตร์มีความก้าวหน้าในด้านระบบชีววิทยา และมีการค้นพบวิธีต่างๆ ในการทดสอบเซลล์และเนื้อเยื่อซึ่งเป็นพื้นฐานการเปลี่ยนแปลงที่สามารถนำไปใช้ในการตัดสินใจถึงความเสี่ยงของสารเคมี (risk chemical) ที่มีต่อมนุษย์ ช่วยให้นักวิทยาศาสตร์พิจารณาถึงผลของการสัมผัสสารเคมีว่าอยู่ในระดับใดจึงจะมีผล ทำให้การทำงานของเซลล์และระบบชีวเคมีของร่างกายได้รับผลกระทบจนก่อให้เกิดโรค

3. การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์

เป็นการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์หลังจากเหนี่ยวนำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ขึ้นในเซลล์สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจลดการตายของเซลล์เนื่องจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) และเซลล์ที่ตาย (dead cell) หรือทดสอบจากการทำงานของไมโทคอนเดรีย และคำนวณเซลล์ที่มีชีวิต เป็นร้อยละของความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) วิธีที่นิยมทดสอบ คือ MTT reduction assay

วิธี MTT reduction assay

หลักการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT reduction assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) คือการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยวัดจาก mitochondrial succinic dehydrogenase activity ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมี mitochondrial function ในเซลล์ Krebs cycle ที่เกิดใน mitochondria เป็น metabolic pathway ที่สำคัญในการสังเคราะห์ adenosine triphosphate จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน

หลักการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT reduction assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) คือการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยวัดจาก mitochondrial succinic dehydrogenase activity ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมี mitochondrial function ในเซลล์ Krebs cycle ที่เกิดใน mitochondria เป็น metabolic pathway ที่สำคัญในการสังเคราะห์ adenosine triphosphate จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยขั้นตอนต้น คือ การเปลี่ยนจาก succinate ไปเป็น fumarate โดย succinic dehydrogenase (SDH) ส่วน FAD เป็นตัวที่ทำให้ปฏิกิริยา reduction สมบูรณ์โดยผ่าน $FADH_2$ และ $FADH_2$ สามารถเปลี่ยน tetrazolium salt ไปเป็น formazan ที่มีสีน้ำเงินและตกตะกอนใน mitochondria โดยการทดสอบนี้ต้องการ disodium succinate เป็นตัวตั้งต้นเมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์มีผลทำให้มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำเงิน และระดับของการเปลี่ยนสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ enzymatic reduction ของ tetrazolium salt ผลึกของ MTT formazan สามารถละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ก่อนที่จะนำไปอ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าที่อ่านได้จะบอก mitochondrial activity และเซลล์ที่มีชีวิต

โดย สามารถคำนวณ %cell viability จากสมการ

$$\%cell\ viability = \frac{\text{Absorbance of treated cell}}{\text{Absorbance of control cell}} \times 100$$

Caco-2 human intestinal cells

Caco-2 เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ที่มีการแสดงออกและลักษณะคล้ายคลึงกับเซลล์ epithelial ปกติ ซึ่งลักษณะต่างๆ ของ Caco-2 แสดงในตารางที่ 2 เซลล์เหล่านี้จะมีความแตกต่างเมื่อ monolayer มาบรรจบกัน ซึ่งวิธีการดูแลเซลล์เหล่านี้จะใช้สภาวะแบบเดียวกันกับการเลี้ยงเซลล์ทั่วไป ในระหว่างช่วง phase แรกของเซลล์จะปล่อย colonocyte และ enterocyte-specific protein การ expression ของ colonocyte ทำให้ลักษณะทางชีวเคมีของ enterocyte เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งลักษณะของ monolayer จะมีลักษณะของเซลล์ที่เกิดการจัดเรียงกันโดยมี tight junction และบริเวณยึดจับของเซลล์ ซึ่งจะแยกระหว่าง apical microvillar และ basolateral membrane (Muangnoi, 2007)

การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ย่านาง (Yanang) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels จัดอยู่ใน วงศ์ Menispermaceae มีชื่อพื้นเมืองว่า เถาย่านาง จ้อยนาง เถาเขียว เถาวัลย์เขียว หย้าภคินี เครือเขางาม ย่านาง ยานาง วันยอ ย่านางเป็นไม้เลื้อยตระกูลเดียวกับเถาวัลย์ มีลักษณะเป็นเถา ใบเดี่ยวยาวรี รูปไข่ ใบหนาผิวเรียบเป็นมันมีสีเขียวเข้ม เมื่ออ่อนจะมีขนสีเทาขึ้นตามเถา เถาแก่จะมีผิวเกลี้ยงเหนียว ขนาดของใบยาว 5-10 เซนติเมตร กว้าง 2-4 เซนติเมตร ขอบใบเรียบ ก้านใบยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ออกดอกสีเหลืองมีขนาดเล็ก ออกเป็นช่อสั้นๆ ตามง่ามใบ ผลกลมใหญ่ เมื่อแก่จัดมีสีเข้ม เมล็ดในมีสีดำ ย่านางเป็นพืชที่พบในแหล่งธรรมชาติบริเวณป่าผสมผลัดใบ ป่าดงดิบ และป่าโปร่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวมทั้งภาคอื่นก็มีกระจายทั่วไป ย่านางเป็นพืชที่ขึ้นในดินทุกชนิด และปลูกได้ทุกฤดู ขยายพันธุ์โดยการใช้หัวและการเพาะเมล็ด (Smitinand & Larson, 1991)

ชาวอีสานใช้เถาใบอ่อน ใบแก่ตำคั้นเอาน้ำลิ้เขียวซึ่งมีลักษณะเหนียวและนำไปต้มกับ หน่อไม้ปรุงเป็นแกงหน่อไม้ หรือซุบหน่อไม้ บางแห่งนำไปแกงกับขี้เหล็ก หรือน้ำคั้นย่านางไปใส่แกง ขนุน อ่อม และหมก ซึ่งเป็นอาหารอีสานอีกด้วย นอกจากนั้นยังพบว่าใบย่านางมีคุณค่าทาง สารอาหาร โดยเฉพาะสารเบต้าแคโรทีน แคลเซียม และธาตุเหล็ก ในปริมาณสูง ส่วนรากย่านาง มี สารอัลคาลอยด์หลายชนิด เช่น ทิเลียโคริน (Tiliacoline) ทิเลียโคลินิน (Tiliacolinine) นอร์ทิเลียโครินิน (Nor-tiliacolinine) เป็นต้น ชาวบ้านมักใช้รากย่านางมาต้มดื่มเพื่อใช้เป็นยาแก้พิษและแก้ไข้เกือบ ทุกชนิด เช่น ไข้หวัด ไข้สวกอัส เป็นต้น (Mahidol, Sahakitpichan, & Ruchirawat, 1994 และ Wiriyachita & Phuriyakorn, 1981)

เครือหมาน้อย (Krueo Ma Noy) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Cissampelos pareira* จัดอยู่ในวงศ์ Menispermaceae มีชื่ออื่นๆว่า กรุงเขมา ขงเขมา พระพาย หมอน้อย หมาน้อย ก้นปัด และสีฟัน เครือหมาน้อยเป็นเถาเนื้อแข็งขนาดกลาง ใบเดี่ยว รูปหัวใจ มีขนปกคลุมทั่วไปทั้งบนใบและท้องของใบ ก้านใบปัด ดอกตัวผู้และตัวเมียแยกจากกัน มีขนาดเล็ก เมล็ดโค้งงอเหมือนพระจันทร์ครึ่งซีก เครือหมาน้อย เป็นพืชที่พบในแหล่งธรรมชาติ เกิดอยู่ตามที่รกร้างว่างเปล่าในป่าเขาทั่วไปในเขตร้อน (Smitinand & Larson, 1991) นอกจากนี้รากของเครือหมาน้อยจะมีสารประกอบส่วนใหญ่เป็นพวก แอลคาลอยด์ มีสรรพคุณทางยาช่วยลดไข้ แก้ปวด ขับปัสสาวะ แก้ทางเดินหรือกระเพาะปัสสาวะอักเสบ คลายกล้ามเนื้อและลดความดันโลหิต เป็นต้น (Caceres, Giron, & Martinez, 1978; Dwumabadu et al., 1975; Manske & Holmes, 1954)

ชาวอีสานใช้ใบมาช้ำกับน้ำ กรองเอากากออก ผสมด้วยข่าหั่นฝอย ต้นหอมซอย ตะไคร้หั่น ฝอย พริกป่น เกลือป่น คนให้เข้ากัน ทิ้งไว้จะแข็งตัวเหมือนวุ้น เรียกว่าวุ้นหมาน้อย จัดเป็นอาหารคาว หรือจะทำเป็นขนมหวานก็ได้ โดยผสมกับน้ำเชื่อมหรือน้ำหวานแทน Singthong และคณะ (2004,

2005) ได้มีการศึกษาสารสกัดประเภทกัมจากใบเครือหมาน้อยที่ทำให้เกิดเจล พบว่าเป็นเพคตินโดยมีโครงสร้างหลักคือ กรดกาแลคทูโรนิก ที่ต่อกันด้วยพันธะ α (1,4) และจัดเป็น low methoxyl pectin

รางจืด (*Thunbergia Laurifolia* Lindl.) พืชในวงศ์ Acanthaceae เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มี รุ้งจกกันดีและใช้แพร่หลายในวงการแพทย์แผนโบราณ จากตำรายาสมุนไพร (ชะลอ 2519, เสงี่ยม 2535, วุฒิ 2540, พนิตา 2542, วิทย์ 2539) กล่าวว่ารางจืดมีรสเย็นใช้ปรุงเป็นยาแก้ปวดท้องพิษไข้ แก้ เบื่อเมา แก้ร้อนใน กระหายน้ำ และใช้รักษาผู้ป่วยที่ถูกพิษต่าง ๆ เช่น พิษจากสุราเห็ดเมา พิษ เนื่องจากอาการแพ้ หรือรับประทานสัตว์ที่มีพิษ รวมทั้งใช้รักษาผู้ที่ได้รับสารเคมีที่มีพิษร้ายแรง เช่น สารหนู สตริกนิน และสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ (พาณี และ ชัชวดี 2523) จากการศึกษาของ Oonsivilai et al., (2007) พบว่าสารสกัดอะซีโดน สารสกัดเอทานอล และสารสกัดน้ำของรางจืดมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ phase II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบ detoxification ของร่างกายและยังพบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ในการเป็นสารต่อต้านการก่อกลายพันธุ์ใน *Salmonella typhimurium* TA 98 และ TA 100 ซึ่งผลการศึกษาสามารถอธิบายการใช้รางจืดในการแก้พิษ เบื่อเมา ในการใช้สมุนไพรชนิดนี้ได้

มีรายงานการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและเภสัชวิทยาของรางจืดดังนี้ สารเคมีที่พบในรางจืด ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม flavonoids ได้แก่ apigenin, cosmodin และ delphinidin-3,5-di-O- β -D-glucoside วิรุทธ (2522) วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำสกัดใบรางจืดพบว่ามี amino acids 4 ชนิดคือ methionine, serine, glycine, และ unidentified amino acid แต่ได้สกัดด้วย petroleum ether พบ steroids 8 ชนิด และ carotenoid หนึ่งชนิด รัชฎาพรและคณะ (2007) ได้ศึกษา phytochemical profiling ของสารสกัดรางจืดน้ำ อะซีโดน และเอทานอลโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography พบว่า caffeic acid และ apigenin เป็นส่วนประกอบหลักของสารสกัดน้ำ ขณะที่ สารประกอบ chlorophyll a, chlorophyll b, pheophorbide a, pheophytin a, และ lutein เป็น ส่วนประกอบหลักของสารสกัดอะซีโดนและสารสกัดเอทานอล

ศิริวรรณ (2522) พบว่าสารสกัดใบรางจืดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Aerobacter aerogens* ได้ ในขณะที่ Kongyingyos และคณะ (1990) ใช้น้ำสกัดใบรางจืดยับยั้งการเจริญ ของไวรัส herpes simplex type 1 และ Chanawirat (2000) ใช้สารสกัดจากใบรางจืดลดพิษต่อตับของ แอลกอฮอล์ในหนูขาวได้ ส่วนสุพรและคณะ (2541) ได้พัฒนาสารสกัดใบรางจืดเป็นยาทาภายนอก สำหรับต้านการอักเสบ เพราะสามารถต้านการอักเสบในหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้มีการทดสอบยืนยันว่าน้ำสกัดใบรางจืดสามารถลดอัตราการตายของหนูขาว เนื่องจากพิษของสารกำจัดแมลงได้ (พาณี และ ชัชวดี, 2523, วิรุทธ, 2523) และยังสามารถลด อุณหภูมิในหนูขาวได้ด้วย (บุษบง, 2521)

เร็ว ๆ นี้ รัชฎาพรและคณะ (2007) ได้ทดสอบคุณสมบัติในการแก้พิษของสารสกัด รังจืดโดยวัดค่าการเพิ่มการออกตามฤทธิ์ของเอนไซม์ NAD(P)H: quinine oxidoreductase (NQO1) ในเซลล์ตับชนิด Hepa 1c1c7 พบว่า สารสกัดอะซีโตนมีฤทธิ์ในการเพิ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ NQO1 สูงสุด 2.8 เท่าเมื่อเทียบกับตัวควบคุม รองลงมาคือสารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำซึ่งมีฤทธิ์ ในการเพิ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ 1.35 และ 1.56 เท่าตามลำดับและทำการทดสอบฤทธิ์การเป็นสารก่อ กลายพันธุ์และการต่อต้านฤทธิ์ของสารก่อกลายพันธุ์ พบว่าสารสกัดรังจืดทุกชนิดมีฤทธิ์ด้านการก่อ กลายพันธุ์ของ 2 Amino-anthracene สูงสุดที่ สายพันธุ์ TA 98 และ TA100.

สารสกัดน้ำแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการตรวจสอบด้วยวิธี DPPH assay ที่ค่า EC_{50} สูงสุดที่ 0.13 มิลลิกรัมกรดกลูติกต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดเอทานอลและอะซีโตนแสดงค่า EC_{50} ที่ 0.26 และ 0.61 มิลลิกรัมกรดกลูติกต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้การแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการตรวจสอบด้วยวิธี FRAP assay สูงสุดที่ 0.93 มิลลิโมลต่อกรัมในสารสกัดน้ำ รองลงมาเป็น สารสกัดเอทานอลและอะซีโตนที่ค่า 0.18 และ 0.04 มิลลิโมลต่อกรัม ตามลำดับ



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การเตรียมสารสกัดย่านาง เครื่องหมายน้อย และรางจืด

3.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำใบย่านาง รางจืด และเครื่องหมายน้อย มาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับรางจืด และ 3 ชั่วโมงสำหรับย่านางและเครื่องหมายน้อย จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดแล้วบรรจุใส่ถุงพร้อมปิดผนึกแบบสุญญากาศ และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3.1.2 การเตรียมสารสกัด

ชั่งตัวอย่างย่านาง/ รางจืด/ เครื่องหมายน้อย 100 mg เติมน้ำร้อน 100°C / เอทานอล / อะซีโตน 12 ml นำไปแช่ด้วย Shaking water bath 25°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ 3000 g 3 นาที 4°C เก็บส่วนใสโดยกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วนำตะกอนที่เหลือไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ปริมาตรส่วนใสให้ครบ 50 ml จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 2 ml ใส่หลอดทดลองแล้วนำไปทำให้แห้งด้วย Freeze dryer และ Vacuum dryer สำหรับสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลกับอะซีโตน ตามลำดับ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.2. การวิเคราะห์ปริมาณของ Total phenolic

โดยการทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลาย น้ำ หรือ อะซีโตน หรือเอทานอล แล้ว ปิเปตสารละลายตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำ 1.58 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ทิ้งไว้ 5 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต (20% w/v) 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วจึงเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และหา Total Phenolic Compound โดยใช้ gallic acid เป็นมาตรฐาน ระดับความเข้มข้นของ gallic acid ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานคือ 0 , 50 , 100 , 150 และ 200 ppm ใน 95% เอทานอล ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปสมมูลของมิลลิกรัม gallic acid ต่อ 100 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง

3.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระ

3.3.1 วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

โดยการละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำ อะซีโตน หรือเอทานอล แล้ว ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย DPPH 1.90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex แล้วเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และคำนวณหา % inhibition จากสูตร

$$\% \text{ Inhibittion} = \left(\frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

3.3.2 วิธี Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)

โดยทำการเตรียมสารละลาย FRAP จากสารละลาย acetate buffer (pH 3.6), TPTZ 10 mM ใน HCl เข้มข้น 40 mM และสารละลาย Ferrous chloride เข้มข้น 20 mM ในอัตราส่วน 10:1:1 (v/v) ตามลำดับ สารละลาย FRAP จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน และนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาใช้

ในทดสอบด้วยวิธีนี้ จะใช้สารสกัดปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลาเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร โดยทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Ferric sulfate ที่มี ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 100-2000 μM โดยทำการทดลองจำนวนสามซ้ำและหาค่าเฉลี่ย

3.3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

เตรียมสารละลาย ABTS⁺ cation radical โดยการผสมสารละลาย ABTS 14 mM 5 ml และ 4.9 mM potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 5 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนใช้นำสารละลาย ABTS⁺ มาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.700 ± 0.020 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นปิเปตสารละลาย ABTS⁺ 950 μl ผสมกับ สารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 50 μl โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้ BHT และ Trolox เป็นชุดควบคุม จากนั้นคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (%) ตามสมการ

$$\text{ABTS scavenging effect } \% = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100$$

โดย A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank และ A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2 cell) ได้รับจากมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก โดยใช้ passage ที่ 29-32 ทำการเลี้ยงเซลล์ใน 75-T flask (ขนาด 75 cm²) โดยเซลล์ที่ใช้ในการเลี้ยงเริ่มต้นเท่ากับ 4×10^5 cells/cm² และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ complete medium ที่มีกลูโคสในปริมาณสูง (DMEM) ใช้ 10.0 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), กรดอะมิโนไม่จำเป็น (non-essential amino acid) 10 มิลลิกรัม/ลิตร, แอล-กลูตามีน (L-glutamine) 2.0 มิลลิกรัม/ลิตร, แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร, เจนตาไมซิน (gentamicin) 50 มิลลิกรัม/ลิตร, HEPES 15 มิลลิโมล/ลิตร และ โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) 44 มิลลิโมล/ลิตร

3.5 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

เลี้ยง Caco-2 cell line ใน 96-well plate โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 500 เซลล์/ช่อง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดรางจืดที่เตรียมได้เจือจางด้วยเอทานอล และละลายสารสกัดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ ซึ่งอยู่ในช่วง 2 ug/ml ถึง 600 ug/ml โดยใช้ DMSO 0.1% เป็นตัวอย่างควบคุม

ทำการบ่มสารสกัดใน Caco-2 cell line เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาดังกล่าว เปิดสารสกัดออกจากเซลล์ และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปใหม่ บ่มต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบด้วย MTT โดยเติม MTT ที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml ใน PBS ปริมาตร 50 μ l ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์และ MTT ออก แล้วล้างด้วย DMSO ปริมาตร 200 μ l และ Sorensen's Glycine Buffer, pH 10.5 ปริมาตร 25 μ l นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร นำไปหาพล็อตกราฟ dose-response โดยพิจารณาที่ความเข้มข้นของสารสกัดจำนวน 8 ระดับ ใช้ค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น จาก 96-well plate จำนวน 4 ช่อง แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถทำลายเซลล์ได้ 50% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด (ED₅₀)

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

อภิปรายผลการทดลอง

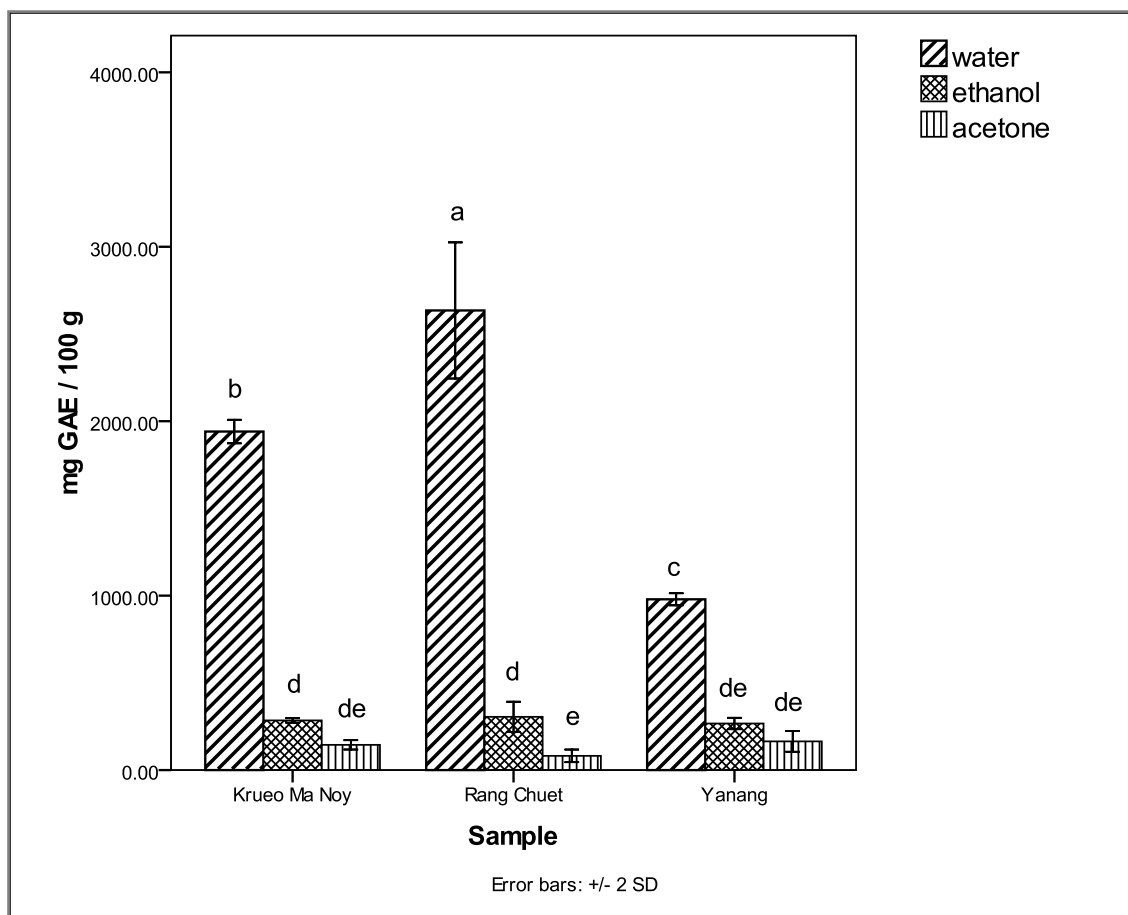
1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดย่านาง รังจืด และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันคือ น้ำ, เอทานอล, และอะซิโตน วิเคราะห์โดยใช้ Folin-Ciocalteu reagent ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดแต่ละชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าเอทานอล และอะซิโตน โดยรังจืดที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด (2,634.87 mg GAE / 100 g RM) ตามด้วยเครือหมาน้อยและย่านางที่สกัดด้วยน้ำ (1,940.73 mg GAE / 100 g RM และ 978.99 mg GAE / 100 g RM ตามลำดับ) ส่วนรังจืดที่สกัดด้วยอะซิโตนมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดต่ำสุด (81.58 mg GAE / 100 g RM) โดยปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรังจืดมีปริมาณใกล้เคียงกับการศึกษาของรัชฎาพรและคณะ (2006)

ตารางที่ 1 : ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดย่านาง รังจืด และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

Samples	Total Phenolics (mg GAE / 100 g RM)		
	Water	Ethanol	Acetone
Rang Chuet	2634.87 \pm 195.054 ^a	305.24 \pm 43.436	81.58 \pm 18.121
Yanang	978.99 \pm 17.348	267.03 \pm 16.416	164.56 \pm 29.684
Krueo Ma Noy	1940.73 \pm 33.845	284.74 \pm 6.454	144.66 \pm 13.355

^a หมายถึง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 4 : เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสาร ของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อย ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (mg GAE / 100 g RM) โดยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับรางจืดกับสมุนไพรประเภทขี้ผึ้ง เช่น Tropical herbal tea, Temperature herbal tea และ Camellia tea พบว่า สารสกัดรางจืดน้ำมีปริมาณของ Total phenolic ใกล้เคียงกับกลุ่ม Tropical herbal tea เช่น ใบกระเพรา, ตะไคร้, ใบบัวบก (Chan, et al., 2010)

2. การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

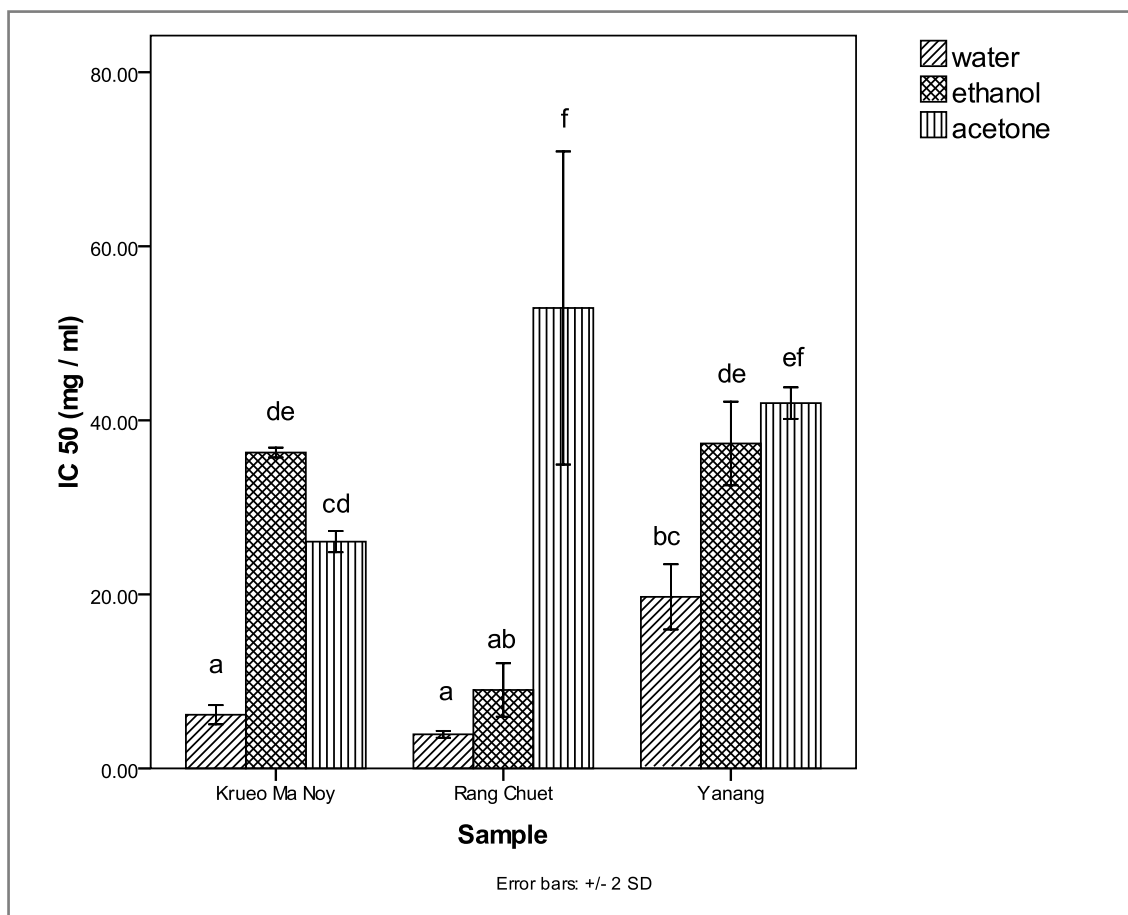
การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสาร สกัดในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรที่อยู่ในสารละลาย โดย DPPH คือ อนุภาคอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระ

ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการทำให้อาการแพ้ของ DPPH[•] ลดลง 50% (IC₅₀) โดยใช้ BHT และ Ascorbic acid เป็นตัวควบคุมได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 โดยพบว่า รังจืดที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (3.920 mg / ml) ตามด้วย เครื่องหมายที่สกัดด้วยน้ำ (6.170 mg / ml) และรังจืดที่สกัดด้วยเอทานอล (9.015 mg / ml) ส่วนรังจืดที่สกัดด้วยอะซิโตนพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด (52.910 mg / ml)

ตารางที่ 2 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ของสารสกัดย่านาง, รังจืด, และเครื่องหมายที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

Samples	IC ₅₀ (mg / ml)		
	Water	Ethanol	Acetone
Rang Chuet	3.920 ± 0.198 ^a	9.015 ± 1.534	52.910 ± 8.994
Yanang	19.715 ± 1.874	37.340 ± 2.404	41.980 ± 0.905
Krueo Ma Noy	6.170 ± 0.099	36.300 ± 0.283	26.060 ± 0.608
BHT	0.339 ± 0.039 mg / ml		
Ascorbic cid	0.036 ± 0.007 mg / ml		

^a หมายถึง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 5 : เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ของสารของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (IC_{50} mg/ml) โดยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

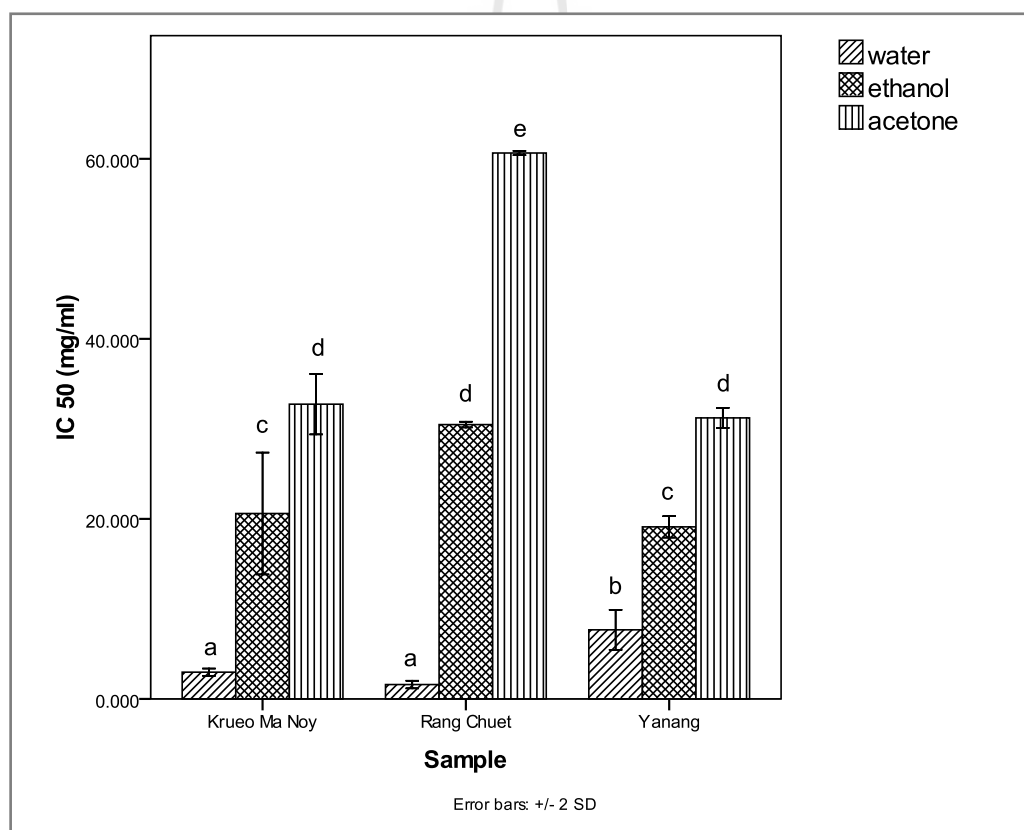
เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดย ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระด้วยการเติมโซเดียมเปอร์ซัลเฟต ($K_2S_2O_8$) และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

ในการศึกษาได้วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดโดยใช้ BHT และ Trolox เป็นตัวควบคุม ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 โดยพบว่า รางจืดที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (1.598 mg / ml) ตามด้วยเครือหมาน้อยและย่านางที่สกัดด้วยน้ำ (2.973 mg / ml, และ 7.676 mg / ml ตามลำดับ) ส่วนรางจืดที่สกัดด้วยอะซิโตนพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด (60.647 mg / ml)

ตารางที่ 3 : ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

Samples	IC ₅₀ (mg / ml)		
	Water	Ethanol	Acetone
Rang Chuet	1.598 ± 0.211 ^a	30.477 ± 0.159	60.647 ± 0.118
Yanang	7.676 ± 1.112	19.114 ± 0.595	31.221 ± 0.558
Krueo Ma Noy	2.973 ± 0.202	20.599 ± 3.384	32.744 ± 1.678
BHT	0.0853 ± 0.0094		
Trolox	0.0488 ± 0.0078		

^a หมายถึง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 6 : เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (IC₅₀ mg/ml) โดยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.05)

2.3 การวัดสมบัติการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด

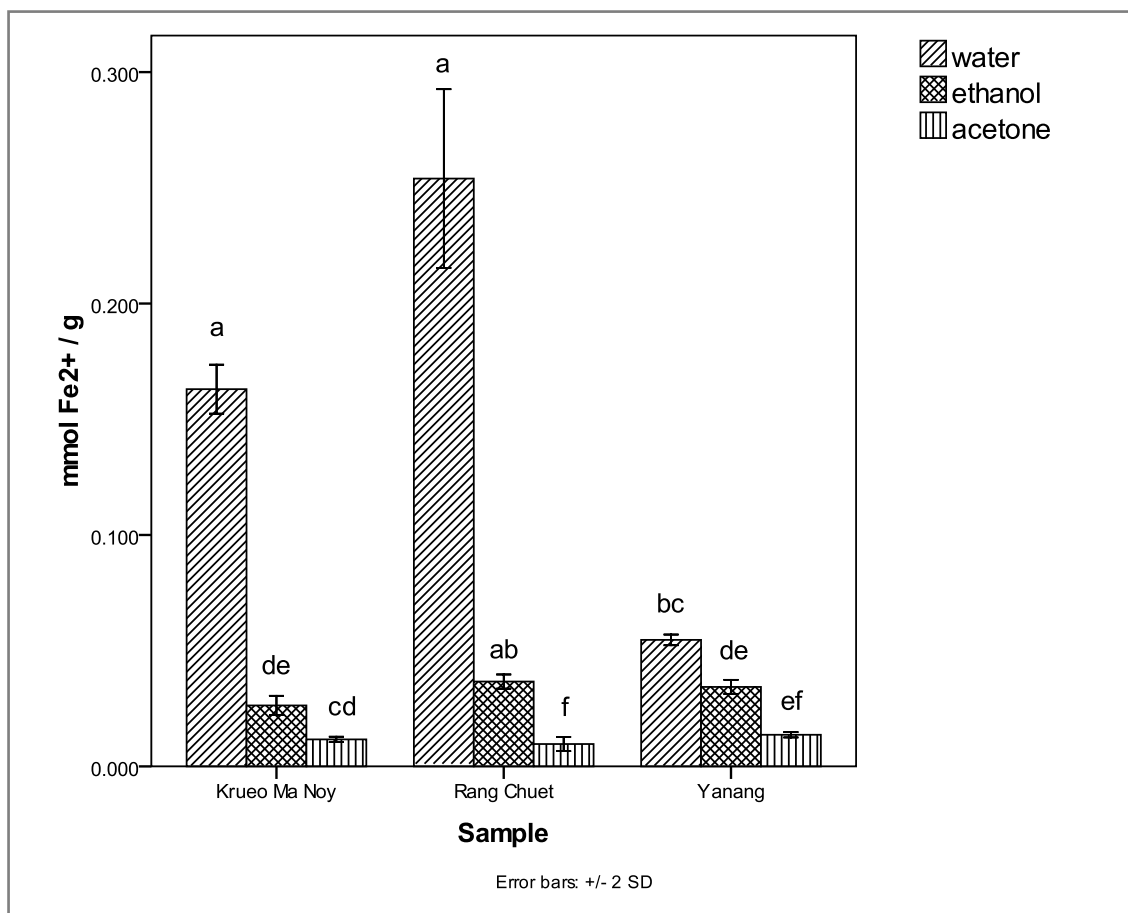
Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดซึ่งเกิดจากการรีดิวซ์ โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริก Fe^{3+} กับ TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+} กับ TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

ในการศึกษา สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด พบว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเอทานอล และอะซีโตน ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยรังจืดที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ($0.254 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g RM}$) ตามด้วยเครือหมาน้อยและย่านางสกัดด้วยน้ำ ($0.163 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g RM}$ และ $0.054 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g RM}$ ตามลำดับ) และรังจืดที่สกัดด้วยอะซีโตนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด ($0.010 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g RM}$)

ตารางที่ 4 : สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดย่านาง, รังจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

Samples	Total Antioxidant activity ($\text{mmol Fe}^{2+} / \text{g RM}$)		
	Water	Ethanol	Acetone
Rang Chuet	0.254 ± 0.0193^a	0.037 ± 0.0015	0.010 ± 0.0015
Yanang	0.054 ± 0.0012	0.034 ± 0.0015	0.014 ± 0.0006
Krueo Ma Noy	0.163 ± 0.0053	0.026 ± 0.0021	0.012 ± 0.0010
BHT	2.369 ± 0.141		

^a หมายถึง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 7 : เปรียบเทียบสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสาร ของสารสกัดย่านาง, รางจืด, และเครือหมาน้อยที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (mmol Fe²⁺ / g RM) โดยตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.05)

จากการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดสมุนไพรทั้งสามชนิดด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดน้ำมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุด โดยสามารถเรียงลำดับความสามารถในการต้านออกซิเดชันตามชนิดของสมุนไพรทั้งสามชนิดได้ ดังนี้ รางจืด เครือหมาน้อย และย่านาง หากเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ BHT, Ascorbic acid และ Trolox พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้งสามชนิดมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารมาตรฐาน และความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจะสอดคล้องกับปริมาณของ Total phenolic ที่มีในตัวอย่าง หากสารสกัดใดมีปริมาณของ Total phenolic มากจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกกับความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของ Jacobo- Velazquez และคณะ(2009)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบในห้องทดลอง (In vitro) โดยใช้เซลล์ไลน์ และส่วนประกอบของเซลล์ ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นั้น ให้ผลที่เชื่อถือได้และเป็นที่ยอมรับ ในขณะที่ผลการทดสอบในสัตว์ทดลองมักจะทดสอบที่ปริมาณสารเคมีสูงเกินความเป็นจริงหลายเท่า ซึ่งอาจไม่สอดคล้องกับปริมาณที่มนุษย์ได้รับจริง นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ ยังประหยัดเวลางบประมาณ สามารถที่จะทดลองซ้ำได้มากกว่า และที่สำคัญไม่ต้องเผชิญกับองค์กรเอกชนที่ต่อต้านการใช้สัตว์ทดลองอีกด้วย (Cetin et.al., 2005)

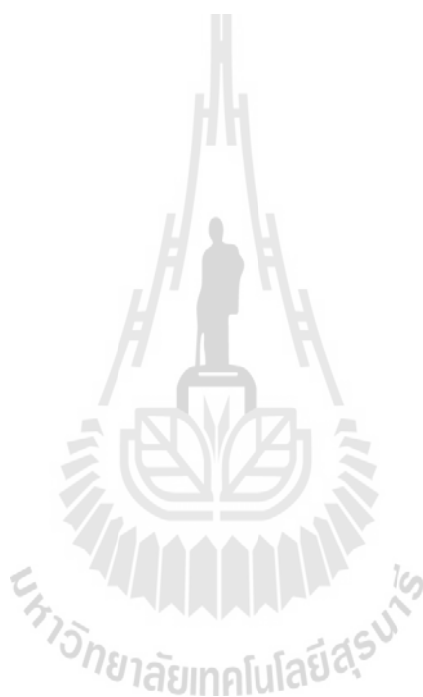
ตารางที่ 5 แสดงค่า IC_{50} ($\mu\text{l/ml}$) ของสารสกัดย่านาง เครือหมาน้อย และรางจืดต่อ Caco-2 cell lines

ประเภทของสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	การสกัด	IC_{50} ($\mu\text{l/ml}$)
ย่านาง	<i>Tiliacora triandra</i> (Colebr.) Diels	น้ำ	>200
		เอทานอล	>350
		อะซีโตน	>200
เครือหมาน้อย	<i>Cissampelos pareira</i>	น้ำ	198±14
		เอทานอล	>200
		อะซีโตน	>200
รางจืด	<i>Thunbergia Laurifolia</i> Lindl.	น้ำ	170±12
		เอทานอล	ND
		อะซีโตน	>200

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดสมุนไพรคือ รางจืด เครือหมาน้อยและย่านางใน Caco-2 cell lines โดยวิธี MTT assay (Mossman, 1983) พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดทุกชนิดมีค่ามากกว่า 100 $\mu\text{g/ml}$ ดังแสดงในตารางที่ 5 และตัวอย่างควบคุมคือ 0.1 % DMSO ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เท่านั้น ดังนั้นจึงถือว่า สารสกัดรางจืด เครือหมาน้อยและย่านาง จัดอยู่ในกลุ่มของสารที่มีความปลอดภัยต่อ Caco-2 cell lines ในปี 2006 Okonogi และคณะ ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันและความเป็นพิษของเปลือกผลไม้บางชนิดต่อ Caco-s cell lines และ peripheral blood mononuclear cells พบว่า สารสกัดจากเปลือกเงาะมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันจากธรรมชาติและ เหมาะสำหรับการนำไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์อาหารหรือผลิตภัณฑ์ยา เนื่องจากมีปริมาณของสารต้านออกซิเดชันค่อนข้างสูงและมีความเป็นพิษต่ำ ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$)

Boivin และคณะ (2009) ได้รายงานว่าสารสกัดจากผักตระกูลกะหล่ำ มีความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์นี้จะแตกต่างกันในเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด และยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการเป็นตัวต้านการเกิดออกซิเดชันของ

พืชแต่ละชนิดอีกด้วย ดังนั้นสมุนไพรทั้งสามชนิดคือ ย่านาง เกรือหมาน้อย และรางจืดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์จึงแตกต่างกันไปด้วย และสอดคล้องกับการศึกษาของ Oonsivilai และคณะ(2008) โดยได้ทำการ ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดรางจืดต่อเซลล์ชนิดต่างๆ รวมทั้ง Caco-2 cell line พบว่า การสกัดด้วย petroleum ether มีพิษกับเซลล์มากกว่าสารสกัดอื่นๆ และสารสกัดน้ำจะมีค่า IC_{50} เท่ากับ 147 ± 15 ซึ่งใกล้เคียงกัน และนอกจากนี้ ยังพบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจะแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของเซลล์



บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด ย่านาง เครือหมาน้อย และรางจืด ในด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและการเป็นสารต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยเตรียมสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำ เอทานอล และอะซิโตน จากการศึกษาพบว่าปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดรางจืดน้ำมีปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด (2,634.87 mg GAE /100 g RM) รองลงมาได้แก่สารสกัดน้ำเครือหมาน้อยและย่านาง (1,940.73 mg GAE /100 g RM และ 978.99 mg GAE /100 g RM) ตามลำดับ ส่วนสารสกัดรางจืดอะซิโตนมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดต่ำที่สุด (81.58 mg GAE / 100 g RM) และเมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดรางจืดน้ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดที่ค่า IC_{50} 3.920 mg/ml, 1.598 mg/ml และ 0.254 mmol Fe^{2+} /g RM ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดน้ำของสมุนไพรทั้งสามชนิด รองลงมาได้แก่เครือหมาน้อย และย่านาง ตามลำดับ

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดสมุนไพรคือ รางจืด เครือหมาน้อยและย่านาง ใน Caco-2 cell lines โดยวิธี MTT assay พบว่า ค่า IC_{50} ของสารสกัดทุกชนิดมีค่ามากกว่า 100 μ g/ml ดังแสดงในตารางที่ 5 และตัวอย่างควบคุมคือ 0.1 % DMSO ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เท่านั้น ดังนั้นจึงถือว่า สารสกัดรางจืด เครือหมาน้อยและย่านาง จัดอยู่ในกลุ่มของสารที่มีความพิษต่ำต่อ Caco-2 cell lines

ดังนั้นการสกัดด้วยน้ำจึงจัดเป็นสารสกัดที่เหมาะสมในการนำไป เนื่องจากมีปริมาณของปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic) มากกว่าสารสกัดอื่นๆ และความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากขึ้นด้วยเช่นกัน นอกจากนี้สารสกัดรางจืด เครือหมาน้อยและย่านาง จัดอยู่ในกลุ่มของสารที่มีความพิษต่ำต่อ Caco-2 cell lines เหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

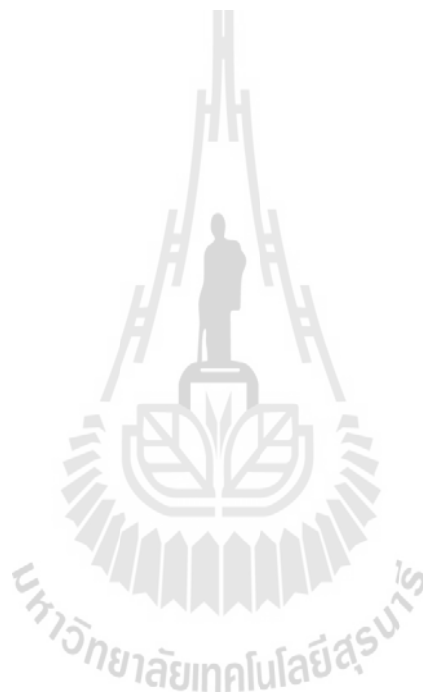
บรรณานุกรม

- ชะลอ อุทกภาชน์. 2519. ยาสุมุนไพรรักษาโรคในประเทศเขตร้อนและวิธีการบำบัดรักษา. กรุงเทพฯ.
แพร์พิทยา. อินเทอร์เน็ต. 244 – 252.
- บุษบง จำเริญดารารัศมี. 2521. ผลของน้ำสกัดใบรางจืดต่ออุณหภูมิของร่างกาย. บทคัดย่อการประชุม
วิชาการเรื่องวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาภาคเหนือ. คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- พนิดา ไหญ่ธรรมสาร. 2542. รางจืด. จุลสารข้อมูลสมุนไพร. 16(1): 4-7.
- พานี เตชะเสน, ชัชวดี ทองทาบ. 2523. การทดลองใช้รางจืดแก้พิษยาฆ่าแมลง. เชียงใหม่เวชสาร.
19(2): 105 – 114.
- วิทย์ เทียงบุญธรรม. 2539. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ. อักษรวิทยา.
676 – 677.
- วิรุทธ จิตรผิงงาม. 2522. การศึกษาสารประกอบรางจืด. วิทยานิพนธ์วิจัยวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
(การสอนเคมี). มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วีรวรรณ เรืองยุทธการณ. 2523. การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของใบรางจืด. วิทยานิพนธ์การวิจัย
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เภสัชวิทยา). มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วุฒิ วุฒิธรรมราช. 2540. สารานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 390.
- ศิริวรรณ ศิลปะสุวรรณ. 2522. การศึกษาผลของสมุนไพรบางชนิดต่อการเจริญของแบคทีเรีย
บางอย่างในตระกูล Enterobacteriaceae. วิทยานิพนธ์การวิจัยวิทยาศาสตร์ (การสอน
ชีววิทยา). มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สุพร จารุมณี และคณะ. 2541. รายงานการวิจัยเรื่องการพัฒนายาทาภายนอกสำหรับด้านการอักเสบ
จากเถารางจืด ตอนที่ 1. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 1-4.
- เสงี่ยม ปิ่นเครือ อ. 2535. ไม้เทศเมืองไทย. กรุงเทพฯ. การพิมพ์ไชยวัฒน์. 455-456.
- Bae, S., and Suh, H. 2007. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea.
LWT - Food Science and Technology. 40 (6): 955-962.
- Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of
uronic acids. Analytical Biochemistry. 54: 484-489.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. 1995. Kinetics and mechanisms of antioxidant
activity using the DPPH free radical method. Food Sci Technol .30: 609-615.
- Carceres, A., Giron, L.M., and Martinez, A.M. 1987. Diuretic activity of plants used for the
treatment of urinary ailments in Guatemala. Journal of Ethnopharmacology. 19: 233-245.

- Chanawirat, A., Toshulkao, C., Temcharoen, P., Glinsukon, T. 2000. Protective effect of *Thunbergia laurifolia* extract on ethanol-induced hepatotoxicity in mice. Thesis, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Chan, E.W.C. , Lim, Y.Y., Chong, K.L., Tan, J.B.L. and Wong, S.K. 2010. Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23:185–189
- Cetin, Y. and Bullerman, L.B. 2005. Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Food and Chemical Toxicology*. 43(5): 755 – 764.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350-356.
- Dwuma-badu, D., Ayim, J.S.K., Mingle, C.A., Tackiet, A.N., Slatkin, D.J., Knapp, J.E., and Schief, P.L. 1975. Constituents of west African, medicine plants part 10, alkaloids of *Cissampelos pareira*. *Phytochemistry*. 14:2520-2521.
- Ee, K.Y., Rehman, A., Agboola, S., and Zhao, J. 2009. Influence of heat processing on functional properties of Australian wattle seed (*Acacia victoriae Benth*) extracts. *Food Hydrocolloids*. 23: 116 – 124.
- Jacobo- Velazquez, D.A. and Cisneros-Zevallos, L. 2009. Correlations of Antioxidant Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data Analysis for Food and Medicinal Plants. *Journal of Food Science*. 74:9
- Ksouri, R. et al., (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology* 47, 2083–2091.
- Lennette, T.H., Barilows, A., Hausler, W.J., and Shadonay, H.J. 1991. *Manual of Clinical Microbiology* (5th ed). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Muangnoi, C. 2007. Bioaccessibility, Cellular uptake and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor activity of triterpenoids from *Centella asiatica* (Linn.) Urban. [M.Sc. thesis in Nutrition]. Bangkok. Faculty of graduate studies. Mahidol University
- Mahidol, C., Sahakitpichan, P. and Ruchirawat, S. 1994. Bioactive natural products from Thai plants. *Journal of Pure and Applied Chemistry*. 66: 2353-2356.

- Manske, R.H.F., and Holmes, H.L. 1954. The Alkaloids Chemistry and Physiology. New York: Academic Press.
- Netzel, M., Netzel, G., Kammerer, D.K., Schiebe, A., Carle, R., Simons, L., Bitsch, I., Bitsch, R., and Konczak, I. 2007. Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 8(3): 365-372.
- Osman, A.M. 2011. Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH[•] and the oxidized form of the polyphenol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412: 473-478.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Ningsanond, S., Bomser, J.A. and Ferruzzi, M.G. 2006. Induction of quinone reductase activity in murine hepatoma cells by extracts of *Thunbergia Laurifolia* Lindl. Presented at EB. Moscone Convention Center, April 1-5, San Francisco, CA.
- Oonsivilai, R., Cheng, C., Bomser, J.A., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Phytochemical profiling and detoxification properties of *Thunbergia Laurifolia* Lindl (Rang Chuet) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 114: 300 – 306.
- Oonsivilai, R., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. Presented at FoSTAT 2007. BITEC, June 14-15, Bangkok, Thailand.
- Punchard, N.A and Kelly, F.J. 1996. Free radicals, a practical approach, IRL Press, Oxford. 271–285
- Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., and O'Brien, C. 2007. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content maturity and variety of *Vaccinium* species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 2686–2693.
- Singthong, J., Cui, S.W., Ningsanond, S. and Goff, D.H. 2004. Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy pectin. *Carbohydrate Polymers*. 58: 391-400.
- Singthong, J., Ningsanond, S., Cui, S.W. and Goff, D.H. 2005. Extraction and physicochemical characterization of Krueo Ma Noy pectin. *Food Hydrocolloids*. 19: 793-801.
- Smitinand, T., and Larsen, K. 1991. Flora of Thailand (Vol. 5 Part 3). Bangkok: The Forest Herbarium, Royal Forest Department.

- Wiriyachitra, P. & Phuriyakorn, B. 1981. Alkaloids of *Tiliacora triandra*. Australian Journal of Chemistry. 34: 2001-2004.
- Yusuf, A.A., Ayedun, H., and Sanni, L.O. 2008. Chemical and functional properties of raw and roasted Nigerian benniseed (*Sesamum indicum*) and bambara groundnut (*Vigna subterranean*). Food Chemistry. 111: 277 – 282.



ภาคผนวก ก



วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 % (w/v)

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid stock solution 5 mg/ml

ละลาย gallic acid 0.5 กรัม ใน 95% เอทานอล 10 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลาย DPPH 62.5 μ M

ละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 2.4643 มิลลิกรัม ในเมทานอลเล็กน้อย จากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 100 มิลลิลิตร

4. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT stock solution 1 mg/ml

ละลาย BHT 50.0 mg ในเอทานอล 95% และปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

5. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid stock solution 0.5 mg/ml

ละลาย Ascorbic acid 25.0 mg ในเมทานอลและปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

6. การเตรียมสารละลาย Acetate buffer 300 mM pH 3.6

ละลายโซเดียมอะซิเตตไตรไฮเดรต 1.55 กรัม ในกรดอะซิติก 8 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

7. การเจือจาง HCl ให้มีความเข้มข้น 40 mM

ปิเปต HCl เข้มข้น (12.04 M) 1.66 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร

8. การเตรียมสารละลาย TPTZ 10 mM

ละลาย TPTZ 0.0312 กรัม ใน 10 มิลลิลิตรของสารละลาย HCl 40 mM โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำมาวิเคราะห์

9. การเตรียมสารละลาย ferrous chloride 20 mM

ละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.054 กรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนนำมาวิเคราะห์

10. การเตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต 2 mM (stock solution)

ละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.0278 กรัมในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

11. การเตรียมสารละลาย potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 4.9 mM

ละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.0662 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

12. การเตรียมสารละลาย ABTS 14 mM

ละลาย ABTS 0.0385 กรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด

13. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox stock solution 10 mg/ml

ละลาย Trolox 50.0 mg ในเอทานอล 95% และปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร

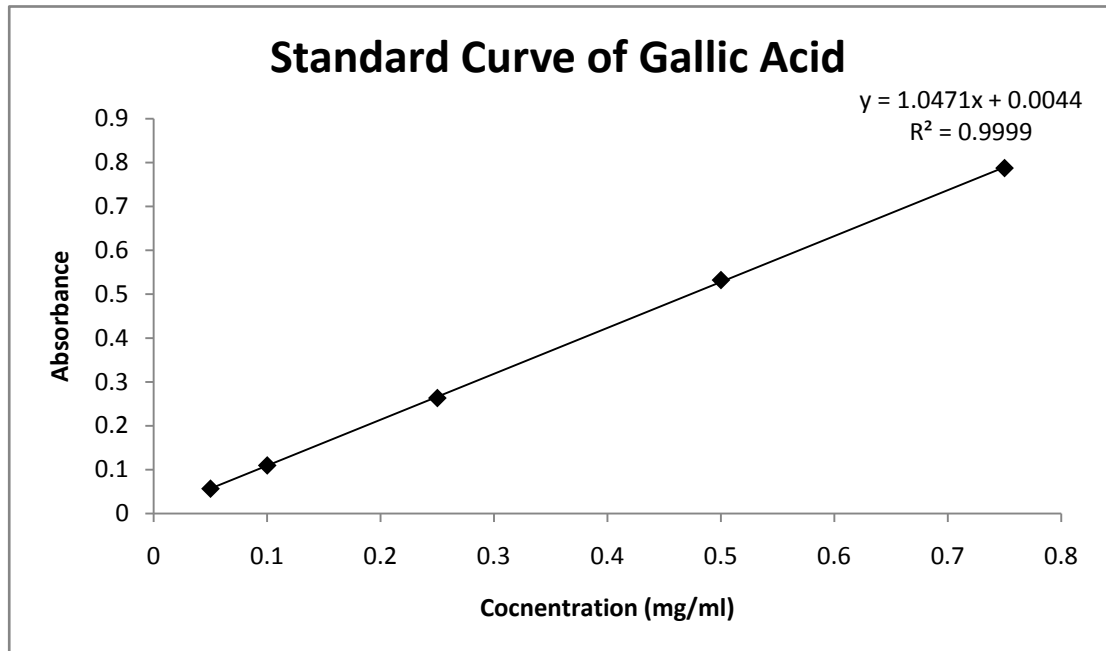
ภาคผนวก ข



กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์

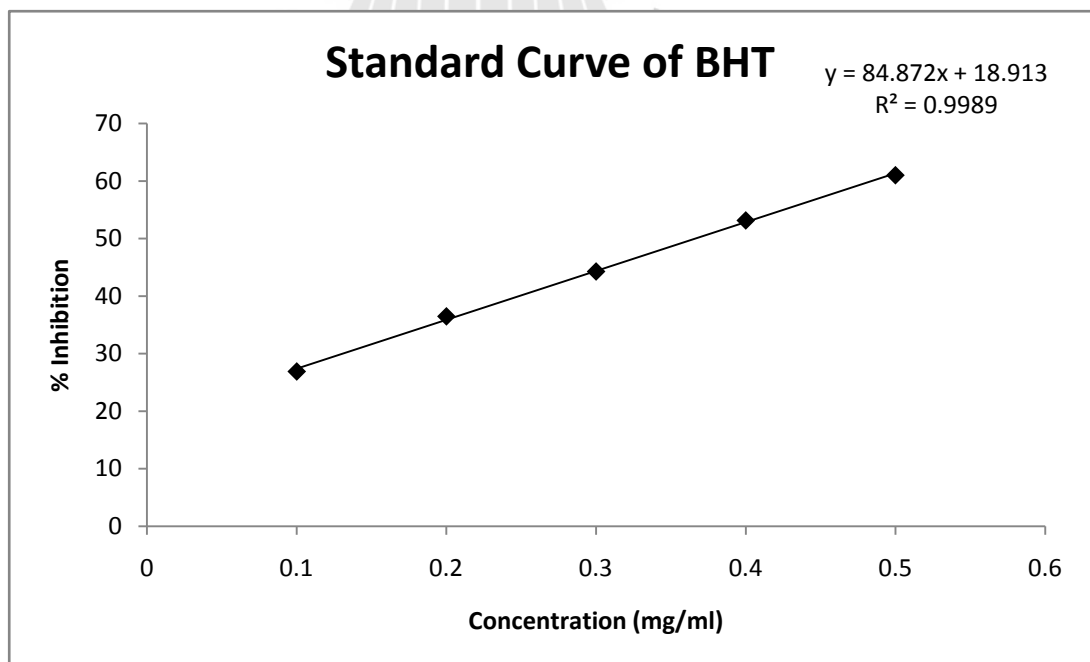
1. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Total Phenolics

1.1 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid

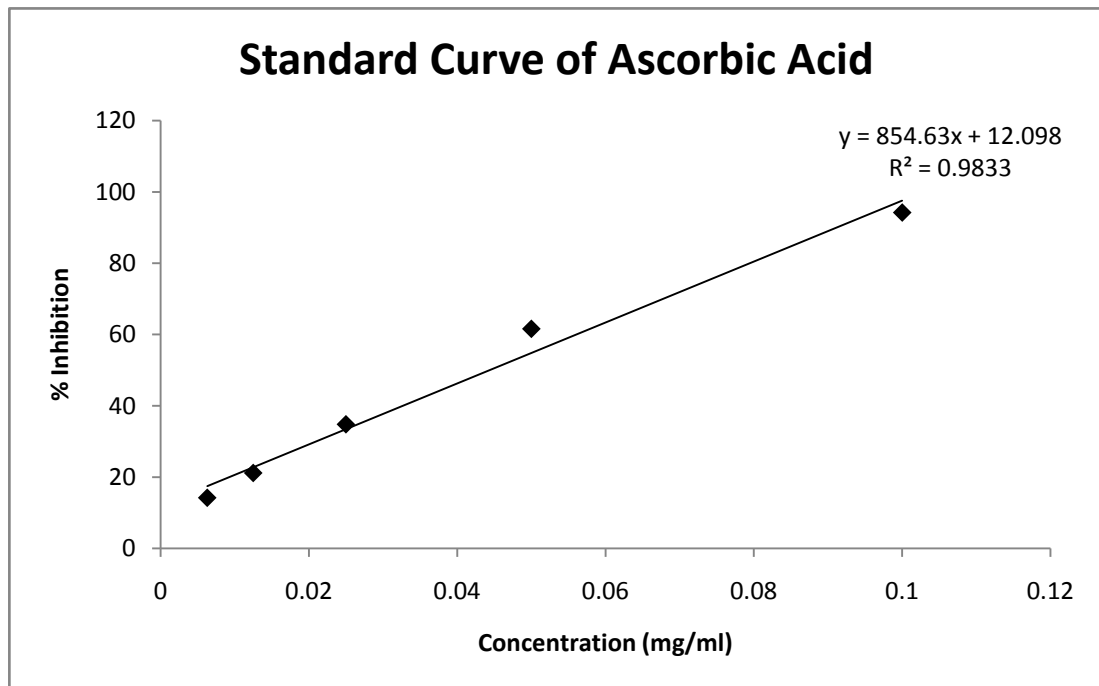


2. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Antioxidation ด้วย DPPH Assay

2.1 กราฟมาตรฐานของ BHT

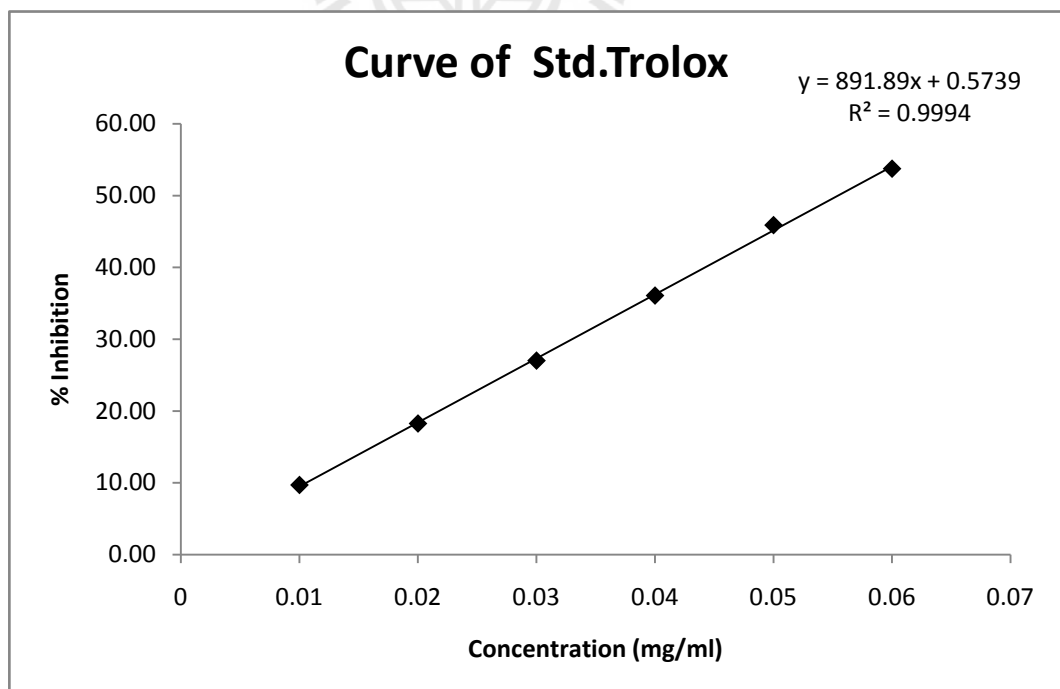


2.2 กราฟมาตรฐานของ Ascorbic acid

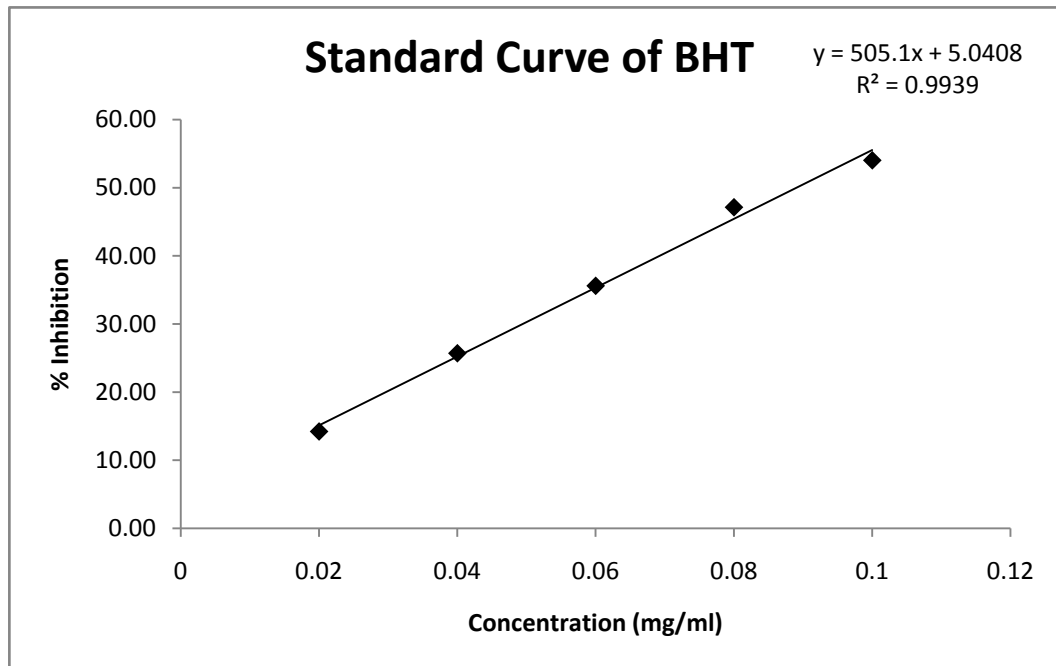


3. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Antioxidation ด้วย ABTS Assay

3.1 กราฟมาตรฐานของ Trolox

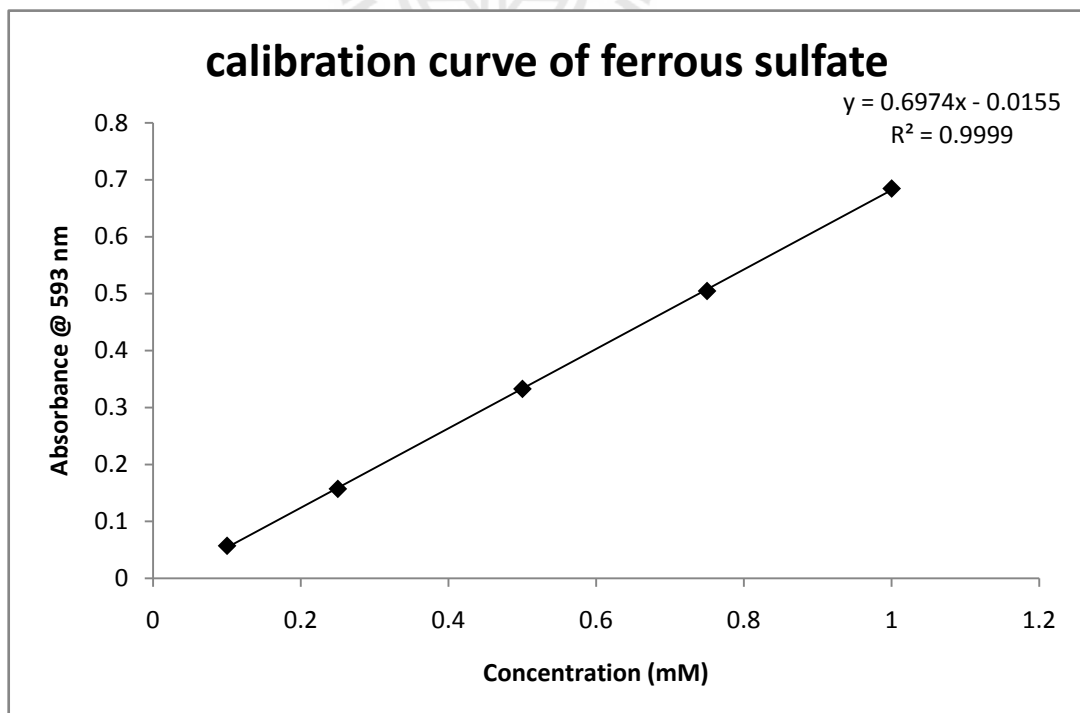


3.2 กราฟมาตรฐานของ BHT



4. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Antioxidation ด้วย FRAP Assay

4.1 กราฟมาตรฐานของ Ferrous sulphate



ประวัติคณะผู้วิจัย (ต้องระบุประวัติคณะผู้วิจัย / ที่ปรึกษาโครงการฯ ครบทุกคน)

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางรัชฎาพร อุ่นศิริไวย
(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Ratchadaporn Oonsivilai
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-4099-00848-97-8
3. ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์ ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 0-442-242-32, 0-442-242-33 โทรสาร 0-442-243-87, 0-442-241-50

E-mail address : roonsivi@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (พยาบาล)

สถาบัน คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปีที่สำเร็จ 2530

ปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

สถาบัน Dalhousie University DalTech, Canada
ปีที่สำเร็จ 2543

หัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทำ : The Effect of β -Glucan Polymers on the
Rheological and Filtration Properties of Wort

แหล่งทุนที่ได้รับ : ทุนผู้ช่วยวิจัย NSERC Canada

ปริญญาเอก สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สถาบัน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีที่สำเร็จ 2549

หัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทำ : Nutraceutical and Functional properties of
Rang Chuet (*Thunbergia Laurifolia* Lindl.) Extracts

แหล่งทุนที่ได้รับ : ทุนพัฒนาอาจารย์ของทบวงมหาวิทยาลัย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
สมุนไพร อาหารเสริมสุขภาพ ฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณสมบัติทางวิทยาการกระแสน้ำของอาหาร

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและ ภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัยหัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : การประยุกต์ใช้ neural network สำหรับค้นหาค่าความเข้มข้นวิกฤตในสารละลาย β -glucan

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

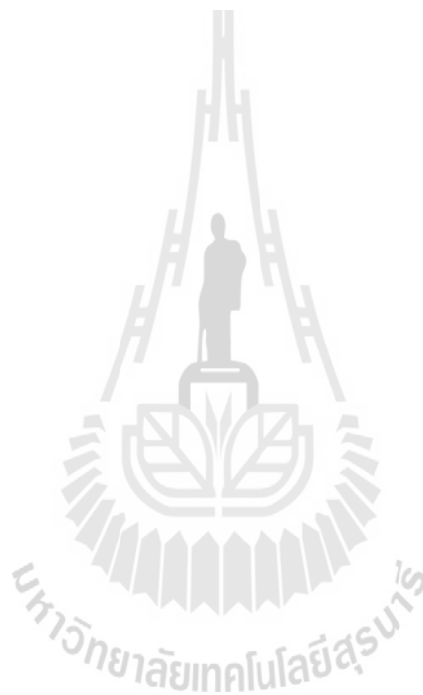
1. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการการประยุกต์ใช้ neural network สำหรับค้นหาค่าความเข้มข้นวิกฤตในสารละลาย β -glucan แหล่งทุน มทส.
2. รายงานฉบับสมบูรณ์เรื่องการเตรียมสารสกัดอุดมด้วยวิตามินซีจากผัก แหล่งทุน IRPUS สกว.

7. Publications:

- 1) **Oonsivilai, R.**, Speers, R.A. and Paulson, A.T. 2000. Effects of pH, maltose and ethanol on the physical properties of model beta-glucan suspensions. Presented at IOB 2000, Institute of Brewing, Asia-Pacific Section 26th Convention, Mar. 19-24, Singapore, SGP.
- 2) **Oonsivilai, R.** Patelakis, S.J.J., Speers, R.A., and Paulson, A.T. 1999. Rheological and filtration properties of beta-glucan polymers in the brewing process. CIFST Annual Meeting, Presentation #OR-12, June 6-9, Kelowna, BC.
- 3) Speers, R. A., Patelakis, S.J.J., A. T. Paulson, and **Oonsivilai, R.** 2004. Shear rate during brewing operations. MBAA TQ vol. 41, no. 3, pp. 241-247.
- 4) **Oonsivilai, R.**, Cheng, C., Ningsanond, S., Bomser, J.A. and Ferruzzi, M.G. 2006. Induction of quinone reductase activity in murine hepatoma cells by extracts of *Thunbergia laurifolia* Lindl. Presented at EB 2006. Moscone Convention Center, April 1-5, San Francisco, CA.
- 5) **Oonsivilai, R.**, Cheng, C., Bomser, J.A., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Phytochemical profiling and detoxification properties of *Thunbergia laurifolia* Lindl (Rang Chuet) extracts. Journal of Ethnopharmacology. 114 pp: 300-306.
- 6) **Oonsivilai, R.**, Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. Presented at FoSTAT 2007. BITEC, June 14-15, Bangkok, Thailand.
- 7) **Oonsivilai, R.** and Oonsivilai, A. 2007. Probabilistic neural network for β -glucan suspensions. Proceedings of the 7th WSEAS International Conference on Simulation,

Modelling and Optimization. Beijing, China, pp. 159-164, ISBN ~ ISSN:1790-5117 , 978-960-6766-07-7.

- 8) Oonsivilai, A. and **Oonsivilai, R.** 2008. Genetic algorithms approach to twin-screw food extrusion process frequency domain parameter estimation. Proceeding of 7th WSEAS Int. Conf. on Applied Computational Science (ACACOS'08), Hangzhou, China, April 6-8. ISBN~ ISSN: 1790-5117, 978-960-6766-49-7.



1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวจิราวรรณ อุ่นเมตตาอารี
(ภาษาอังกฤษ) Miss Jirawan Oonmetta-aree, Ph.D.
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-1014-00557-24-4
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 6
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 0-4425-4000 ต่อ 1325 โทรสาร 0-4427-2939
E-mail: jirawan_o@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญา	สถานศึกษา	ปีที่สำเร็จ
วท.บ.(ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร	2536
วท.ม. (เภสัชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยมหิดล	2540
วท.ด. (เทคโนโลยีอาหาร)	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	2548

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษแตกต่างจากวุฒิการศึกษา ระบุสาขาวิชาการ
 - จุลชีววิทยาทางอาหาร
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย :

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อแผนงานวิจัยและหรือโครงการวิจัย ปีที่พิมพ์

การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

- การใช้ Direct Blot ELISA เพื่อความรวดเร็วในการตรวจหาเชื้อ Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) ในตัวอย่างอาหาร พ.ศ.2540 เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย
- ผลของสารสกัดจากเครื่องเทศตระกูลขิงข่า ต่อการยับยั้งการเจริญ และการเปลี่ยนแปลงสถานะวิทยาของจุลินทรีย์ก่อโรค พ.ศ. 2548 เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย
- ผู้ร่วมวิจัยโครงการวิจัยย่อย การประเมินความเสี่ยงจากสิ่งปนเปื้อนในวัตถุดิบและสัปดาห์ปรุงสำเร็จในเขตพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา และกระบวนการลดสิ่งปนเปื้อนในวัตถุดิบ สัปดาห์ ในชุดโครงการวิจัยการพัฒนาสัปดาห์โคราช เพื่อธุรกิจอาหารสุขภาพแหล่งทุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกอ)

8. Publications:

- 1) **Jirawan** Oonmetta-aree, Tomoko Suzuki, Piyawan Gasaluck and Griangsak Eumkeb. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. LWT - Food Science and Technology. 39 (10): 1214-1220.



1. ชื่อ (ภาษาไทย) ดร.จิตรา สิงห์ทอง
(ภาษาอังกฤษ) Dr. Jitra Singthong
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 5-3014-00061-80-4
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก: สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
โทรศัพท์ 045-353550 โทรสาร 045-288373
E-mail : jitrawara@agri.ubu.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	ชื่อย่อปริญญา และชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2536	ปริญญาตรี	วท.บ. วิทยาศาสตร์บัณฑิต	เทคโนโลยีการอาหาร	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2540	ปริญญาโท	วท.ม. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2547	ปริญญาเอก	วท.ด. วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต	เทคโนโลยีอาหาร	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	ไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษแตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
 - Food Hydrocolloids, Functional Properties, Plant polysaccharides
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

ประสบการณ์การทำวิจัย

อภิญญา เอกพงษ์, เอกสิทธิ์ อ่อนสอาด, วีระ อวิคุณประเสริฐ, จิตรา วราอัสวปติ และเกรียงไกร สร้อยนาค. 2543. การศึกษาการผลิตเต็มหมากนัคในจังหวัดอุบลราชธานี. รายงานโครงการอนุรักษ์ ส่งเสริม เผยแพร่ และพัฒนาศาสนาและศิลปวัฒนธรรม โครงการจัดตั้งภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

จิตรา วราอัสวปติ, เกรียงไกร สถาพรวานิช, อภิญญา เอกพงษ์, เอกสิทธิ์ อ่อนสอาด และวีระ อวิคุณประเสริฐ. 2543. การศึกษาศึกษาภาพการแปรรูปปลาน้ำจืดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ

ประเทศไทย. รายงานโครงการวิจัย. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช).

Singthong, J., Cui, W.S., Ningsanond, S. and Goff, H.D. 2004. Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. Carbohydrate Polymers. 58:391-400.

Singthong, J., Ningsanond, S., Cui, W.S. and Goff, H.D. 2005. Extraction and physicochemical characterization of Krueo Ma Noy pectin. Food Hydrocolloids. 19:793-801.

Singthong, J., Cui, S.W., Lu, X., Ningsanond, S. and Goff, H.D. 2004. Gelation properties of Krueo Ma Noy pectin : Effects of co-solute, salts and pH. Poster presentation at the seventh international hydrocolloids conference, held on August 29 to September 1, 2004, Melbourne, Australia.

Cui, S.W., **Singthong, J.**, Ningsanond, S. and Goff, H.D. 2004. A new hydrocolloids from Krueo Ma Noy leaves : Extraction, structural characterization and some physical properties. Oral presentation at the seventh international hydrocolloids conference, held on August 29 to September 1, 2004, Melbourne, Australia.

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

- การเพิ่มศักยภาพสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ในจังหวัดอุบลราชธานี
- การพัฒนาผลิตภัณฑ์हनเค็มหมากน้ด
- การศึกษาการสกัด องค์ประกอบ และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดจากใบย่านาง

7.2 งานวิจัยที่ท้สำเร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

- การเพิ่มศักยภาพสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ในจังหวัดอุบลราชธานี
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการตามแผนยุทธศาสตร์การพัฒนจังหวัดปีงบประมาณ 2548
- การใช้สารไฮโดรคอลลอยด์เพื่อลดการดูดซับน้ำมันของกล้วยทอด
- ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีเพื่อการพัฒนาและสนับสนุนงานวิจัย งานส่งเสริมการวิจัยฯ สำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีงบประมาณ 2549
- การพัฒนาผลิตภัณฑ์हनเค็มหมากน้ด

ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2549

- การศึกษาการสัปดาห์ องค์ประกอบ และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดจากไยย่านาง

ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2548

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัย ว่าได้ทำการวิจัยคล้วแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

- การสกัดและศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเข้มข้นจากรำข้าว

ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2551

ความก้าวหน้า 80%

